

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2003-530070

(P2003-530070A)

(43) 公表日 平成15年10月14日 (2003.10.14)

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 6 1 K 35/76	4 B 0 2 4
A 6 1 K 35/76		48/00	4 B 0 6 4
38/00		A 6 1 P 1/16	4 B 0 6 5
38/21		31/20	4 C 0 8 4
48/00		43/00	1 1 7 4 C 0 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 71 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-618329(P2000-618329)
 (86) (22) 出願日 平成12年5月19日 (2000.5.19)
 (85) 翻訳文提出日 平成13年11月15日 (2001.11.15)
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 0 0 / 1 3 8 2 7
 (87) 国際公開番号 W O 0 0 / 0 6 9 9 1 3
 (87) 国際公開日 平成12年11月23日 (2000.11.23)
 (31) 優先権主張番号 6 0 / 1 3 4 , 8 9 5
 (32) 優先日 平成11年5月19日 (1999.5.19)
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 レキシジェン ファーマシューティカルズ
 コーポレイション
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ
 02173, レキシントン, ハートウェル
 アベニュー 125
 (72) 発明者 ロウ, キン-ミン
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ
 02420, レキシントン, キャロル レ
 ーン 6
 (74) 代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 F c 融合タンパク質としてのインターフェロン- α タンパク質の発現および搬出

(57) 【要約】

免疫グロブリン F c-インターフェロン- α 融合タンパク質をコードする核酸配列 (例えば、DNA配列または RNA配列) が開示される。この核酸配列は、適切な発現ベクターに挿入され得、哺乳動物細胞において発現され得る。このような核酸配列の発現によって産生され得る免疫グロブリン F c-インターフェロン- α 融合タンパク質のファミリーもまた開示される。例えば、肝炎のような状態を処置するための、このような核酸配列および/または融合タンパク質を使用する方法もまた開示され、この状態は、インターフェロン- α の投与によって軽減される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 融合タンパク質をコードする核酸分子であって、以下：

(a) シグナル配列

(b) 免疫グロブリンFc領域；および

(c) インターフェロナー α を含む標的タンパク質配列

を含み、ここで、該シグナル配列、該免疫グロブリンFc領域および該標的タンパク質配列が、連続的に5'→3'の方向にコードされる、核酸分子。

【請求項2】 前記免疫グロブリンFc領域が免疫グロブリンヒンジ領域を含む、請求項1に記載の核酸分子。

【請求項3】 前記免疫グロブリンFc領域が、免疫グロブリンヒンジ領域および免疫グロブリン重鎖定常領域ドメインを含む、請求項1に記載の核酸分子。

【請求項4】 前記免疫グロブリンFc領域が、免疫グロブリンヒンジ領域および免疫グロブリンCH3ドメインを含む、請求項1に記載の核酸分子。

【請求項5】 前記免疫グロブリンFc領域が、ヒンジ領域、CH2ドメインおよびCH3ドメインを含む、請求項1に記載の核酸分子。

【請求項6】 前記免疫グロブリンFc領域が、免疫グロブリン γ 配列の一部を含む、請求項5に記載の核酸分子。

【請求項7】 前記免疫グロブリン γ が、ヒト免疫グロブリン γ 1である、請求項6に記載の核酸分子。

【請求項8】 哺乳動物細胞をトランスフェクトするための複製可能発現ベクターであって、該ベクターが請求項1に記載の核酸分子を含む、複製可能発現ベクター。

【請求項9】 前記ベクターがウイルスベクターである、請求項8に記載の複製可能発現ベクター。

【請求項10】 請求項1に記載の核酸分子を保有する、哺乳動物細胞。

【請求項11】 アミノ酸末端からカルボン酸末端の方向で、免疫グロブリンFc領域およびインターフェロナー α を含む標的タンパク質を含む、融合タンパク質。

【請求項12】 前記インターフェロン α が、配列番号2、7または8～21に記載されるアミノ酸配列、あるいはその種または対立遺伝子改変体を含む、請求項11に記載の融合タンパク質。

【請求項13】 前記標的タンパク質が、ポリペプチドリンカーによって連結される少なくとも2つのインターフェロン α 分子を含む、請求項11に記載の融合タンパク質。

【請求項14】 前記免疫グロブリンFc領域を前記標的タンパク質に連結するポリペプチドリンカーをさらに含む、請求項13に記載の融合タンパク質。

【請求項15】 前記免疫グロブリンFc領域が、免疫グロブリンヒンジ領域および免疫グロブリン重鎖定常領域ドメインを含む、請求項11に記載の融合タンパク質。

【請求項16】 前記重鎖定常領域ドメインが、CH3ドメインを含む、請求項15に記載の融合タンパク質。

【請求項17】 前記免疫グロブリンFc領域が、ヒンジ領域、CH2ドメインおよびCH3ドメインを含む、請求項11に記載の融合タンパク質。

【請求項18】 共有結合を介して連結される請求項11に記載の少なくとも2つの融合タンパク質を含む、マルチマータンパク質。

【請求項19】 前記共有結合が、ジスルフィド結合である、請求項18に記載のタンパク質。

【請求項20】 融合タンパク質を産生する方法であって、以下の工程：

- (a) 請求項10に記載の前記哺乳動物細胞を提供する工程；および
- (b) 該融合タンパク質を産生するために該哺乳動物細胞を培養する工程、を包含する、方法。

【請求項21】 前記融合タンパク質を回収するさらなる工程を包含する、請求項20に記載の方法。

【請求項22】 前記融合タンパク質を精製するさらなる工程を包含する、請求項20に記載の方法。

【請求項23】 前記免疫グロブリンFc領域と前記標的タンパク質との間に差し挟まれるタンパク質分解性切断部位において、該標的タンパク質から該免

疫グロブリンFc領域を、タンパク質分解酵素を用いて切断するさらなる工程を包含する、請求項20に記載の方法。

【請求項24】 インターフェロン α の投与によって軽減される状態を処置するための方法であって、請求項1に記載の前記核酸を該状態を有する哺乳動物に投与する工程を包含する、方法。

【請求項25】 インターフェロン α の投与によって軽減される状態を処置するための方法であって、請求項8に記載の前記ベクターを該状態を有する哺乳動物に投与する工程を包含する、方法。

【請求項26】 インターフェロン α の投与によって軽減される状態を処置するための方法であって、請求項11に記載の前記融合タンパク質を該状態を有する哺乳動物に投与する工程を包含する、方法。

【請求項27】 インターフェロン α の投与によって軽減される状態を処置するための方法であって、請求項18に記載のタンパク質を該状態を有する哺乳動物に投与する工程を包含する、方法。

【請求項28】 前記状態が、肝臓障害である、請求項26に記載の方法。

【請求項29】 前記肝臓障害が、肝炎である、請求項28に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(関連出願)

本出願は、1999年5月19日に出願された、米国仮特許出願番号60/134,895号(この開示は、本明細書中に参考として援用される)に対して優先権を主張する。

【0002】

(発明の分野)

本明細書中に開示される発明は、インターフェロン- α のタンパク質のクラスのメンバーの産生を高める融合タンパク質発現系に関する。より詳細には、本発明は、免疫グロブリンFc-インターフェロン- α のようなFc融合タンパク質の哺乳動物細胞における抗レベル発現および分泌、ならびにこのFc融合タンパク質の種々の構造的形態および使用に関する。

【0003】

(発明の背景)

タンパク質のインターフェロン- α (INF- α) ファミリーは、種々の疾患の処置において有用であることが示されている。例えば、インターフェロン- α 2aおよび2b(それぞれ商品名RoferonおよびIntron A)は、B型、C型およびD型の慢性肝炎(生命を脅かす肝臓のウイルス性疾患)、尖圭コンジローム(性病いぼ)、AIDS関連カポジ肉腫、ヘアリーセル白血病、悪性黒色腫、基底細胞癌、多発性骨髄腫、腎細胞癌、I型およびII型ヘルペス、水痘/帯状疱疹、および菌状肉腫の処置において使用されている。インターフェロン- α 前立腺癌および慢性骨髄性白血病を含む処置レジメンの効力もまた、研究されている。

【0004】

ヒトインターフェロン- α ファミリーは、インターフェロンのうち最も大きく、最も複雑なファミリーである。このインターフェロン- α ファミリーのメンバーは、他のインターフェロンとは異なるグループとしてそれらを規定する類似したアミノ酸配列を有する;すなわち、これらのタンパク質は、典型的に、典型的

なタンパク質の整列において少なくとも35%のアミノ酸同一性を有する。SwissProtデータベースは、多くのヒトインターフェロン- α タンパク質を含み、これは、代替的に名づけられたインターフェロン- δ タンパク質およびインターフェロン- ω タンパク質を含む。これらのタンパク質は、典型的には、約23個のアミノ酸のリーダー配列を用いて合成され、そして成熟タンパク質は、典型的に、約19kDの分子量を有する。これらのタンパク質が非常に類似しているので、インターフェロン- α がヒトまたは他の哺乳動物供給源から得られ、広範囲に精製されると、種々の生物学的活性を有する同一種(isospecies)の混合物がしばしば得られる[Georgiadisら、米国特許第4,732,683号]。同様に、これらのタンパク質をコードするcDNAは、十分に類似したサイズおよび性質を有するので、単一のセットの手順を使用してプラスミド構築物の目的のためにこれらのcDNAを操作し得る。従って、哺乳動物供給源からインターフェロン- α の単一種を効率的に産生しそして精製するための方法を有することは有用である。

【0005】

約19kDというその比較的小さいサイズ(Lawnら(1981)PROC. NATL. ACAD. Sci. U. S. A. 78:5435)が原因で、インターフェロン- α は、腎臓によって濾過され得る。しかし、濾過される場合、インターフェロン- α は、典型的に、腎臓尿細管細胞によって吸着され、そして代謝され、そして従って、通常排出されない。現在の臨床の実施に従って、処方されたインターフェロン- α は、筋肉内注射によって投与され、その後、その血清中のレベルは、インターフェロン- α 2aについて約5時間の半減期、そしてインターフェロン- α 2bについて2~3時間の半減期で減少する(PHYSICIANS DESK REFERENCE、第50版、1996:2145-2147および2364-2373)。

【0006】

さらに、それらの比較的小さいサイズが原因で、インターフェロン- α の複数回の頻繁な注射が必要であり(通常、毎日または週に3回)、患者のインターフェロン- α のレベルにおいて有意な変化が存在し得る。さらに、注射された用量

が大きく、ヘアリーセル白血病について用量当たり約50マイクログラムからAIDS関連カポジ肉腫についての用量当たり300マイクログラムの範囲にわたる。高レベルの循環インターフェロン- α は、皮膚毒性、神経学的毒性、免疫毒性および内分泌毒性を含む、有意な副作用を生じ得る。インターフェロン- α の小さなサイズによって、このインターフェロン- α は、血液脳関門を通過し、そして中枢神経系に入り得、いくつかの神経学的な副作用の原因となることが考えられる。従って、同時に副作用を最小化しながら、インターフェロン- α を用いて処置される患者における効力および有効な血清半減期を増加することが有用である。

【0007】

インターフェロン- α の高い投薬量、低い効力、短い血清半減期、精製の困難さ、および副作用を考えると、産生を高め、そしてこの治療剤の薬学的性質を改良する方法が当該分野で必要とされている。

【0008】

(発明の要旨)

本発明は、インターフェロン- α を含む融合タンパク質を作製し、そして使用するのに有用な方法および組成物を特徴とする。特に、本発明は、免疫グロブリンFc-インターフェロン- α 融合タンパク質をコードする核酸（例えば、DNAまたはRNA）配列、およびこのような融合タンパク質を産生するために核酸を発現するための方法を特徴とする。融合タンパク質は、生物学的に活性なインターフェロン- α の高レベル発現を容易にし得る。融合タンパク質は、哺乳動物（例えば、ヒト）に投与する前に薬学的に受容可能なキャリアと組み合わせられ得る。特定の条件下において、インターフェロン- α は、処方および/または投与の前に融合タンパク質から切断され得る。あるいは、融合タンパク質を含むインターフェロン- α をコードする核酸配列は、薬学的に受容可能なキャリアと組み合わせられ得、そして哺乳動物に投与され得る。

【0009】

インターフェロン- α の産生および分泌を容易にする新規な核酸配列（例えばDNAまたはRNA）を提供することが本発明の目的である。特に、本発明は、

(i) インターフェロン- α の効率的な産生および分泌を容易にする核酸配列；
(ii) 種々の哺乳動物宿主細胞においてインターフェロン- α の迅速かつ効率的な産生および分泌のための核酸構築物；ならびに (iii) 非ネイティブな、生合成の、またはその他の人工インターフェロン- α タンパク質（例えば、合理的な設計によって作製されたタンパク質）を含む、組換えインターフェロン- α またはその遺伝的に操作された改変体の産生、分泌および回収のための方法を提供する。

【0010】

本発明の他の目的は、インターフェロン- α をコードするポリヌクレオチドに融合される場合、通常の試薬および技術を使用して精製され得る融合ポリペプチドを含むインターフェロン- α をコードするポリヌクレオチド配列を提供することである。なお別の目的は、分泌カセットとコードされるインターフェロン- α タンパク質との間にタンパク質分解性切断部位を差し挟むことであり、その結果、分泌カセットは、インターフェロン- α が独立して精製され得るように、インターフェロン- α ドメインから切断され得る。

【0011】

従って、1つの局面において、本発明は、免疫グロブリンFc領域-インターフェロン- α 融合タンパク質をコードする核酸分子（例えば、DNAまたはRNA分子）を提供する。この核酸分子は、5'→3'の方向で連続的に、単一の配列で、免疫グロブリンFc領域および少なくとも1つの標的タンパク質をコードし、ここで、この標的タンパク質は、インターフェロン- α を含む。

【0012】

好ましい実施形態において、免疫グロブリンFc領域は、免疫グロブリンヒンジ領域を含み、そして好ましくは、少なくとも1つの免疫グロブリン定常重鎖領域ドメイン（例えば、免疫グロブリン重鎖2（CH2）ドメイン、免疫グロブリン定常重鎖3（CH3）ドメイン、およびFc領域を生成するために使用される免疫グロブリンのタイプに依存して、必要に応じて、免疫グロブリン重鎖4（CH4）ドメイン）を含む。より好ましい実施形態において、免疫グロブリンFc領域は、少なくとも免疫グロブリン定常重鎖1（CH1）ドメインを欠いている

。免疫グロブリンFc領域が、任意の免疫グロブリンのクラス（例えば、IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgM）に基づき得るが、IgGに基づく免疫グロブリンFc領域が好ましい。

【0013】

本発明の核酸は、複製可能な発現ベクターへの操作的な結合で組み込まれ得、次いで、このベクターは、コンピテントな哺乳動物宿主細胞に導入され、インターフェロン α に基づく融合タンパク質を産生し得る。得られたインターフェロン α に基づく融合タンパク質は、哺乳動物宿主細胞から効率的に産生かつ分泌される。分泌されたインターフェロン α に基づく融合タンパク質は、哺乳動物細胞を溶解することなく、培養培地から収集され得る。このタンパク質産物は、すべて従来の技術を使用して、活性についてアッセイされ得、そして／または所望されるような共通の試薬を用いて精製され得、そして／または融合パートナーから切断され得る。

【0014】

別の局面において、本発明は、インターフェロン α を含む融合タンパク質を提供する。本発明の融合タンパク質は、ネイティブなインターフェロン α より、改善された生物学的特性（例えば、可溶性の増大、血清半減期の延長、およびそのレセプターへの結合の増加）を実証する。これらの特性は、インターフェロン α の臨床的な効力を有意に改善し得る。好ましい実施形態において、この融合タンパク質は、N末端からC末端の方向で、免疫グロブリンFc領域およびインターフェロン α を、必要に応じて、免疫グロブリンFc領域およびインターフェロン α の間に他の部分（例えば、タンパク質分解部位）を介在させて含む。得られる融合タンパク質は、好ましくは、通常のグリコシル化部位（すなわち、鋳型抗体において通常存在する）でFc領域をグリコシル化する細胞において合成される。

【0015】

別の実施形態において、その融合タンパク質は、第2の標的タンパク質（例えば、成熟の、全長インターフェロン α またはその生物活性フラグメント）を含み得る。この型の構築物において、第1および第2の標的タンパク質は、同じタ

ンパク質かまたは異なるタンパク質であり得る。第1および第2の標的タンパク質は、直接的にまたはポリペプチドリンカーによってのいずれかで、互いに連結され得る。あるいは、両方の標的タンパク質は、直接的にまたはポリペプチドリンカーを介してのいずれかで、免疫グロブリンFc領域に連結され得る。後者の場合、第1の標的タンパク質は、免疫グロブリンFc領域のN末端に連結され得、そして第2の標的タンパク質は、免疫グロブリンのFc領域のC末端に連結され得る。

【0016】

別の実施形態において、2つの融合タンパク質が、共有結合的（例えば、ジスルフィド結合、ポリペプチド結合、または架橋剤によって）または非共有結合的のいずれかで結合して、ダイマータンパク質を産生し得る。好ましい実施形態において、2つの融合タンパク質は、好ましくは、各鎖の免疫グロブリンFc領域中に配置された免疫グロブリンのヒンジ領域中に配置された、少なくとも1つ以上、好ましくは2つの鎖間のシステイン残基を介するジスルフィド結合によって共有結合的に結合される。

【0017】

本発明の他の目的は、インターフェロナー α 融合タンパク質の多価および多量体形態ならびにその組み合わせを提供することである。

【0018】

別の局面において、本発明は、免疫グロブリンFc領域および標的タンパク質を含む融合タンパク質を産生する方法を提供する。本方法は、(a)そのような融合タンパク質（シグナル配列を有するかまたは有さないかのいずれか）をコードするDNA分子を含む哺乳動物細胞を提供する工程、および(b)その融合タンパク質を産生するために哺乳動物細胞を培養する工程、を包含する。次いで、得られる融合タンパク質は、収集され得、必要な場合、再フォールディングされ得、そして当該分野において周知でありかつ使用される従来の精製技術を使用して精製され得る。その融合タンパク質が、免疫グロブリンFc領域と標的タンパク質との間に配置されたタンパク質分解の切断部位を含むと仮定する場合、その標的は、従来のタンパク質分解酵素を使用して融合タンパク質から切断され得、

そして必要な場合、使用に先立って精製される。

【0019】

なおさらなる局面において、本発明は、本発明の方法および／または本発明の融合構築物によって産生されるインターフェロン α の有効量を哺乳動物に投与することによる、インターフェロン α またはその活性化改変体によって緩和される、状態を処置するための方法を提供する。本発明はまた、本発明の核酸（例えば、「裸のDNA」または本発明のDNAもしくはRNAを含むベクター）を、その状態を有する哺乳動物に投与することによって、インターフェロン α またはその活性化改変体によって緩和される、状態を処置するための方法を提供する。

【0020】

好ましい実施形態において、本発明の構築物は、肝臓障害の処置において使用され得、ここで、インターフェロン α は、免疫グロブリンFc領域によって、肝臓内に局在化される。本発明の構築物は、肝障害の処置において特に有用であり得る。肝障害には、ウイルス疾患（例えば、B型肝炎、C型肝炎、もしくはD型肝炎）、肝癌ならびに肝臓に位置する転移を含む他の癌の型が含まれるがこれらに限定されない。

【0021】

本発明の前述のおよび他の目的、特徴、および利点は、以下の詳細な説明、図面、および上記の特許請求の範囲から明らかである。

【0022】

（発明の詳細な説明）

多くの状態が、インターフェロン α の投与によって軽減され得る。例えば、以前に議論したように、インターフェロン α 2aおよび2b（それぞれ、商品名RoferonおよびIntron A）は、慢性のB型肝炎、C型肝炎、およびD型肝炎、尖圭コンジローム（性器いぼ）、AIDS関連カポジ肉腫、ヘアリーセル白血病、悪性黒色腫、基底細胞癌、多発性骨髄腫、腎臓細胞癌、I型およびII型ヘルペス、水痘-帯状疱疹ウイルス、ならびに菌状肉腫の処置において有用である。さらに、研究が、前立腺癌および慢性骨髓性白血病の処置にお

けるインターフェロン- α の効力を評価するために実行されている。

【0023】

肝炎の処置のために、例えば、肝臓に濃縮されているインターフェロン- α の形態を有することが特に有用であり得る。このようにして、他の組織中のインターフェロン- α の濃度が最小化され得、それによって副作用を減少する。肝臓組織は、可溶性免疫複合体の除去のための主要な部位であり、そしてFcレセプターは、肝臓マクロファージ（クップファー細胞）上で豊富である（Benace rraf, B. ら（1959）J. IMMUNOL. 82:131; Paul, W. E.（1993）FUNDAMENTALS IMMUNOLOGY, 第3版、第5章、113-116）。従って、インターフェロン- α を免疫グロブリンFc領域に融合させることによって、インターフェロン- α 分子は、免疫グロブリンFc領域を欠く同じインターフェロン- α 分子と比較して、肝臓組織に好ましく標的化され得る。Fcレセプターについての最も高い親和性を有するIgG型の抗体は、IgG1である。しかし、対照的に、IgG4は、例えば、Fc γ レセプターIに対しておよそ10分の1の低い親和性を有する（AndersonおよびAbraham（1980）J. IMMUNOL. 125:2735; Woofら（1986）MOL. IMMUNOL. 23:319）。IgG1由来のFc γ 1は、リガンドのC末端に配置された場合に、そのリガンドについてのレセプターを発現する細胞に対する抗体依存性細胞媒介細胞傷害性（ADCC）を媒介し得る。さらに、Fc γ 1は、リガンドのC末端に存在する場合に、そのリガンドについてのレセプターを発現する細胞に対するC1q結合および補体結合を媒介し得る。

【0024】

IgG1とは対照的に、IgG4は、補体結合を有効には行わない。このことは、N末端インターフェロン- α が、IgG4由来のC末端Fc領域に融合され得るという提案をもたらした（Chang, T. W. ら、米国特許第5,723,125号）。しかし、IgG4のFc領域がFab領域から分離される場合に、IgG4のFcは、補体ならびにIgG1のFc領域を結合する（Isenman, D. E. ら（1975）J. IMMUNOL. 114:1726）。この

結果ならびに Ig G 1 の F c 配列および Ig G 4 の F c 配列が全く同一であるという事実に基づく、理論に束縛されることは望まないが、Ig G 4 の F a b 領域が、C 1 q 結合および補体結合を立体的にブロックすることが考えられる。なぜなら、Ig G 4 F a b 領域および F c 領域を接続するヒンジ領域は、Ig G 1 のヒンジよりも短いからである。大きな、立体的にかさ高い Ig G 4 の F a b 領域が低分子（例えば、インターフェロン- α ）で置換された場合、ならびに、インターフェロン- α および F c 領域が可撓性リンカーによって接続される場合、このようなインターフェロン- α -F c- γ 4 融合物は、インターフェロン- α レセプターを有する細胞に結合されるときに補体結合することが考えられる。

【0025】

N 末端サイトカインおよび C 末端 F c 領域の融合に起因する細胞毒性効果は周知である。例えば、F c 領域に対するサイトカインインターロイキン-2 (IL-2) の融合物は、補体結合を行い得、そして IL-2 レセプターを有する細胞の溶解を引き起こし得る分子を作製する (L and o l f i, N. F. 米国特許第 5, 349, 053 号)。

【0026】

F c 領域がリガンドの N 末端に配置されている融合物（「イムノフュージン (immunofusion)」または「Fc-X」融合物と名付けられ、ここで X は、インターフェロン- α のようなリガンドである）は、多数の独特の、有利な生物学的特性を有する (L o r a, 米国特許第 5, 726, 044 号および同第 5, 541, 087 号; L o r a (1998) PROTEIN ENGINEERING 11:495)。特に、このような融合タンパク質は、細胞表面上の関連する F c レセプターになお結合し得る。しかし、そのリガンドが細胞表面上のそのレセプターに結合する場合、F c 領域の配向が変化し、そして ADCC および補体結合を媒介する配列が閉ざされるようである。結果として、Fc-X 分子中の F c 領域は、ADCC または補体結合を有効には媒介しない。従って、Fc-X 融合物は、増大した血清半減期ならびに、ADCC および補体結合からの有害な効果がほとんど与えない、肝臓における相対的な濃度を有することが予想される。

【0027】

本発明のFc-X構築物の1つの特徴は、肝臓において標的タンパク質（この場合においては、インターフェロン- α ）を濃縮することである。γ1鎖およびγ3鎖由来のFc領域は、Fc領域についての最大の親和性を示し、γ4鎖は、減少した親和性を示し、そしてγ2鎖は、Fcレセプターに対して極度に低い親和性を示す。従って、γ1鎖またはγ3鎖由来のFc領域は、好ましくは本発明のFc-X構築物中で使用される。なぜなら、それらは、Fcレセプターについて最大の親和性を有し、従って、インターフェロン- α を優先的に肝臓組織に標的化し得るからである。このことは、X-Fcタンパク質（例えば、インターフェロン- α -Fc融合タンパク質）とは対照的である。ここでは、肝臓における濃度の潜在的な利点は、この融合タンパク質が、インターフェロン- α のレセプターを有する細胞に対するエフェクター機能（すなわち、補体結合およびADCC）を媒介し得るという事実によってバランスが保たなくてはならない。

【0028】

従って、本発明は、免疫グロブリンFc領域および少なくとも1つの標的タンパク質（本明細書中ではインターフェロン- α と呼ばれる）を含む融合タンパク質を規定するアミノ酸配列をコードする核酸配列を提供する。本発明の具体的なタンパク質構築物の3つの例示的な実施形態は、図1A～1Cとして図面で例証される。ダイマー性の構築物が好ましいので、すべては、隣接するサブユニット中のシステイン残基間の一对のジスルフィド結合によって架橋されたダイマーとして図示される。図面において、ジスルフィド結合は、各重鎖中の免疫グロブリンヒンジ領域を介して2つの免疫グロブリン重鎖Fc領域を互いに連結させるように描かれ、従って、これらの分子のネイティブな形態に特徴的である。Fcのヒンジ領域を含む構築物は好ましく、そして治療薬剤として有望であることが示されてきたが、本発明は、他の位置での架橋が所望されるように選択され得ることを意図する。さらに、いくつかの状況において、本発明の実施において有用なダイマーまたはマルチマーは、非共有結合（例えば、疎水性相互作用）によって産生され得る。ホモダイマー性構築物が、本発明の重要な実施形態であるので、図面はそのような構築物を例証する。しかし、ヘテロダイマー性構築物もまた、

本発明の実施において有用であることが理解されるべきである。

【0029】

図1Aは、本明細書中に示される原理に従って産生されるダイマー性構築物を例証する(例えば、実施例1を参照のこと)。ホモダイマーの各モノマーは、ヒンジ領域を含む免疫グロブリンFc領域1、CH2ドメイン、およびCH3ドメインを含む。インターフェロン- α 2は、直接的に(すなわち、ポリペプチド結合を介して)、Fc領域のC末端に結合する。Fc領域が、ポリペプチドリンカーを介して標的タンパク質に結合され得ることが理解されるべきである(示さず)。

【0030】

図1Bおよび1Cは、タンデムに配列されかつリンカーによって接続された複数のインターフェロン- α タンパク質を標的タンパク質として含む、本発明のタンパク質構築物を示す。図1Bにおいて、標的タンパク質は、全長インターフェロン- α 2、グリシン残基およびセリン残基からできているポリペプチドリンカー4、およびインターフェロン- α の活性改変体3を含む。図1Cは、大部分のC末端タンパク質ドメインが第2のインターフェロン- α の全長コピー2を含むという点で図1Bの構築物とは異なる。図1A~1Cは、Fc-X構築物を表すが(ここで、Xは標的タンパク質である)、本発明の有用なタンパク質はまた、式X-Fc-Xによって示され得、ここでXは、同じかまたは異なる標的タンパク質を示し得ることが考えられる。

【0031】

本明細書中で使用される場合、用語「ポリペプチドリンカー」は、天然では互いに自然に連結していない2つのタンパク質を互いに連結し得るポリペプチド配列を意味すると理解される。ポリペプチドリンカーは、好ましくは、複数のアミノ酸(例えば、アラニン、グリシン、およびセリン、またはこのようなアミノ酸の組み合わせ)を含む。好ましくは、そのポリペプチドリンカーは、約10~15残基長の一連のセリンおよびグリシンのペプチドを含む。例えば、米国特許第5,258,698号を参照のこと。しかし、最適なリンカー長およびアミノ酸組成が、慣用的な実験によって決定され得ることが意図される。

【0032】

本明細書中使用される場合、「多価」とは、2つ以上の生物学的に活性なセグメントを取り込む組換え分子をいう。多価分子を形成するタンパク質フラグメントは、必要に応じて、構成成分の一部と結合しかつ各々が独立して機能することを可能にするポリペプチドリンカーを通して連結され得る。

【0033】

本明細書中使用される場合、用語「二価」とは、配置Fc-XまたはX-Fc（ここで、Xは標的分子である）を有する多価組換え分子をいう。免疫グロブリンFc領域は、例えば、鎖間のジスルフィド結合を介して結合して、図1Aに示される構築物の型を産生し得る。本発明の融合構築物が配置Fc-X-Xを有する場合、得られるFc分子は、図1Cに示される。2つの標的タンパク質は、ペプチドリンカーを通して連結され得る。図1Aに示される型の構築物は、標的分子とそのレセプターの間の見かけの結合親和性を増加させ得る。

【0034】

本明細書中使用される場合、用語「マルチマー」とは、共有結合的に（例えば、共有結合的相互作用（例えば、ジスルフィド結合））または非共有結合的に（例えば、疎水性相互作用）よってのいずれかの、2以上のポリペプチド鎖の安定な結合をいう。用語マルチマーは、ホモマルチマー（ここではサブユニットは同じものである）ならびにヘテロマルチマー（ここではサブユニットは異なる）の両方を含むことが意図される。

【0035】

本明細書中使用される場合、用語「ダイマー」のは、2つのポリペプチド鎖が、共有結合相互作用または非共有結合相互作用を介して安定に結合された特定のマルチマー分子をいう。このような構築物は、図1Aに概略的に示される。免疫グロブリンFc領域（少なくともヒンジ領域の部分を含む）、CH2ドメインおよびCH3ドメインが、ダイマーを代表的に形成することが理解されるべきである。多くのタンパク質リガンドは、ダイマーとしてそれらのレセプターに結合することが既知である。タンパク質リガンドXが、天然に二量体化する場合、Fc-X分子におけるX部分は、より高度に二量体化する。なぜなら、二量体化プロ

セスは、濃度に依存するからである。Fcによって結合される2つのX部分は物理的に近接している。この分子内プロセスの二量体化により、ダイマーの方へ平衡が大きくシフトし、そしてレセプターへの結合を増強する。

【0036】

本明細書中で使用される場合、用語「インターフェロン- α 」は、全長成熟インターフェロン- α （例えば、ヒトインターフェロン- α 1（配列番号8）、ヒトインターフェロン- α 2（配列番号9）、ヒトインターフェロン- α 4（配列番号10）、ヒトインターフェロン- α 5（配列番号11）、ヒトインターフェロン- α 6（配列番号12）、ヒトインターフェロン- α 7（配列番号13）、ヒトインターフェロン- α 8（配列番号14）、ヒトインターフェロン- α 10（配列番号15）、ヒトインターフェロン- α 14（配列番号16）、ヒトインターフェロン- α 16（配列番号17）、ヒトインターフェロン- α 17（配列番号18）、ヒトインターフェロン- α 21（配列番号19）、ヒトインターフェロン Δ 1（配列番号20）、I I-1（インターフェロン ω -1）（配列番号21））；およびマウスインターフェロン- α 1（配列番号22）、マウスインターフェロン- α 2（配列番号23）、マウスインターフェロン- α 4（配列番号24）、マウスインターフェロン- α 5（配列番号25）、マウスインターフェロン- α 6（配列番号26）、マウスインターフェロン- α 7（配列番号27）、マウスインターフェロン- α 8（配列番号28）、およびマウスインターフェロン- α 9（配列番号29）ならびにそれらの改変体および生理活性フラグメントを意味すると理解される。インターフェロン- α の既知の配列は、GenBankで見出され得る。

【0037】

用語、生理活性フラグメントは、任意のインターフェロン- α タンパク質フラグメントいう。このフラグメントは、配列番号2の鋳型ヒトインターフェロン- α タンパク質の、少なくとも50%、より好ましくは少なくとも70%、そして最も好ましくは少なくとも90%の生物学的活性を有する。配列番号2の鋳型ヒトインターフェロン- α タンパク質は、実施例4の細胞増殖阻害アッセイを使用して決定される。用語、改変体は、種改変体および対立形質改変体、ならびに他

の天然に生じるか、または非天然に生じる改変体（例えば、遺伝的操作プロトコールによって作製される）を含む。これらの改変体は、配列番号2に開示された成熟ヒトインターフェロノン- α タンパク質に少なくとも70%類似であるか、または60%同一であり、より好ましくは少なくとも75%類似であるか、または65%同一であり、そして最も好ましくは少なくとも80%類似であるか、または70%同一である。

【0038】

候補ポリペプチドが、参照ポリペプチドに類似または同一の要求性パーセントを有するかどうかを決定するために、候補アミノ酸配列および参照アミノ酸配列は、動的プログラミングアルゴリズム（SmithおよびWaterman（1981）J. MOL. BIOL. 147:195-197）を、BLOSUM62置換マトリックス（HeinkoffおよびHenikoff（1992）「Amino acid substitution matrices from protein blocks」PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 89:10915-10919の図2に記載される）と組み合わせて、使用して最初に整列される。本発明について、ギャップ挿入ペナルティについての適切な値は、-12であり、そしてギャップ伸長ペナルティについての適切な値は、-4である。Smith-WatermanのアルゴリズムおよびBLOSUM62マトリックスを使用するアルゴリズムを実施するコンピュータープログラム（例えば、GCG program suit（Oxford Molecular Group、Oxford、England））は市販され、そして当業者によって広く使用される。

【0039】

一旦、候補配列と参照配列との間のアライメントが作製されると、類似性パーセントのスコアが計算され得る。各配列の個々のアミノ酸は、互いの類似性について連続して比較される。2つの整列されたアミノ酸に対応するBLOSUM62マトリックスにおける値が、ゼロまたは負の数である場合、ペアの類似性スコアはゼロである；別のペアの類似性スコアは1.0である。生の類似性スコアは、整列されたアミノ酸のペアの類似性スコアの合計である。次いで生のスコアは

、候補配列または参照配列の小さなほうのアミノ酸の数での除算によって規格化される。規格化された生のスコアは、類似性パーセントである。あるいは、同一性パーセントを計算するために、各配列の整列されたアミノ酸は、連続して再び比較される。アミノ酸が、非同義である場合、ペアの同スコアはゼロである；他のペア同一性スコアは、1.0である。生の同一性スコアは、同一の整列されたアミノ酸の合計である。次いで、生のスコアは、候補配列または参照配列の小さいほうのアミノ酸の数での除算によって規格化される。規格化された生スコアは、同一性パーセントである。挿入および欠失は、類似性および同一性パーセントを計算する目的のために無視される。従って、ギャップペナルティーは、この計算に使用されないが、最初のアライメントにおいては使用される。

【0040】

改変体は、インターフェロン- α 様活性を有する他のインターフェロン- α 変異体タンパク質も含み得る。種改変体および対立形質改変体としては、ヒトおよびマウスインターフェロン- α 配列が挙げられるが、これらに限定されない。ヒトインターフェロン- α 改変体は、配列番号8～21に示され、そしてマウスインターフェロン- α 改変体は、配列番号22～29に示される。

【0041】

さらに、インターフェロン- α 配列は、配列番号7に示されるコンセンサス配列の一部またはすべてを含み得、ここでインターフェロン- α は、配列番号2の成熟ヒトインターフェロン- α （実施例4の細胞増殖阻害アッセイを使用して決定される）の、少なくとも50%、より好ましくは少なくとも70%、そして最も好ましくは少なくとも90%の生物学的活性を有する。

【0042】

これらのタンパク質は、非常に類似の精製特性および他の生物学的特性を有する。特に、Fcインターフェロン- α タンパク質のDNA操作、融合タンパク質発現、および融合タンパク質精製特性は、非常に類似している。例えば、ヒトインターフェロン- α 2aおよびヒトインターフェロン- α 2bは、1アミノ酸のみ異なり、従って、インターフェロン- α 2aは、インターフェロン- α 2bがアルギニン残基を有するのと同じ位置にリジン残基を有する。ヒトインターフェ

ロン α 2aおよびヒトインターフェロン α 2bは、非常に類似した特性を有し、そしてすべての公知の目的に交換可能である。

【0043】

インターフェロン α の三次元構造は、X線結晶学によって解かれた(Ramasaamyら、(1986) STRUCTURE 4:1453)。インターフェロン α タンパク質の配列は、非常に類似しているため、決定された構造は、全体のタンパク質ファミリーについての構造とみなされる。インターフェロン α の三次元構造は、インターフェロン β の構造と同様に、ダイマーインターフェースで亜鉛イオンを有するダイマーである。しかし、溶液中において、インターフェロン α は、モノマーとして振舞う。サイトカインIL-6および他のタンパク質リガンドから類推して、インターフェロン α が、レセプター結合の際に二量体化し得ることが提案されている(Radhakrishnan, Rら、(1996) STRUCTURE 4:1453; Karpusas, Mら(1997) PROC. NAT. ACAD. SCI. USA 94:11813)。

【0044】

リガンドの二量体化は、リガンドとそのレセプターとの間の見かけ上の結合親和性を増加し得る。例えば、Fcインターフェロン α 融合タンパク質の1つのインターフェロン α 部分が細胞上のレセプターに、特定の親和性で、結合し得る場合、同じFcインターフェロン α 融合タンパク質の第2のインターフェロン α 部分は、同じ細胞上の第2のレセプターに、より高い結合力(見かけ上の親和性)で結合し得る。これは、以下のための生じる。第1のインターフェロン α 部分が既に結合した後に第2のインターフェロン α 部分の、レセプターへの物理的な近接に起因して生じる。抗体が抗原に結合する場合、見かけ上の親和性は、少なくとも10000(すなわち 10^4)倍に増加し得る。各タンパク質サブユニット(すなわち「X」)は、それ自身の独立した機能を有し、その結果、多価分子において、タンパク質サブユニットの機能は相加的または相乗的であり得る。従って、正常なダイマーFc分子の、インターフェロン α への融合により、インターフェロン α の活性を増加し得る。従って、図1Aに示されるこ

の型の構築物は、インターフェロンとそのレセプターとの間の見かけ上の結合親和性を増加し得る。

【0045】

本明細書中に開示される標的タンパク質は、免疫グロブリンのFc領域を有する融合タンパク質として発現される。既知のように、各免疫グロブリン重鎖定常領域は、4または5のドメインを含む。これらのドメインは、以下のように連続して名付けされる：CH1-ヒンジ-CH2-CH3（-CH4）。重鎖ドメインのDNA配列は、免疫グロブリンカセット間の交差相同性を有する（例えば、IgGのCH2ドメインは、IgAおよびIgDのCH2ドメインに対して相同性であり、そしてIgMおよびIgEのCH3ドメインに対して相同性である）。

【0046】

本明細書中で使用される場合、用語「免疫グロブリンFc領域」は、免疫グロブリン鎖定常領域のカルボニル末端部分、好ましくは免疫グロブリン重鎖定常領域、またはその一部を意味すると理解される。例えば、免疫グロブリンFc領域は、以下を含み得る：1) CH1ドメイン、CH2ドメイン、およびCH3ドメイン、2) CH1ドメインおよびCH2ドメイン、3) CH1ドメインおよびCH3ドメイン、4) CH2ドメインおよびCH3ドメイン、または5) 2以上のドメインの組み合わせおよび免疫グロブリンヒンジ領域。好ましい実施形態において、免疫グロブリンFc領域は、少なくとも免疫グロブリンヒンジ領域CH2ドメインおよびCH3ドメインを含む、そして好ましくはCH1ドメインを欠く。重鎖定常領域がIgG（Ig γ ）（ γ サブクラス1、2、3、または4）に由来する免疫グロブリンのクラスが現在好ましい。ヒトFc γ -1のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、配列番号3および4に示される。他のクラスの免疫グロブリン、IgA（Ig α ）、IgD（Ig δ ）、IgE（Ig ϵ ）およびIgM（Ig μ ）が使用され得る。適切な免疫グロブリン重鎖定常領域の選択は、米国特許第5,541,087号および同5,726,044号に記載される。特定の結果を達成するために特定の免疫グロブリンクラスおよびサブクラスから特定の免疫グロブリン重鎖定常領域配列を選択することは、当業者の範囲内

であると考えられる。免疫グロブリンFc領域をコードするDNA構築物の一部は、好ましくは、少なくともヒンジドメインの一部、そして好ましくは少なくともFc γ のCH3ドメインの一部または任意のIgA、IgD、IgEまたはIgMの相同性ドメインの一部を含む。

【0047】

適用に依存して、ヒト以外の種（例えば、マウスまたはラット）からの定常領域遺伝子が使用され得る。DNA構築物における融合パートナーとして使用される免疫グロブリンFc領域は、一般的に任意の哺乳動物種に由来し得る。ここで、宿主細胞または動物におけるFc領域に対する免疫応答を誘発することは望ましくなく、Fc領域は宿主細胞または動物と同じ種に由来し得る。例えば、宿主動物または細胞がヒトである場合、ヒト免疫グロブリンFc領域は、使用され得る；同様に、宿主動物または細胞がマウスである場合に、マウス免疫グロブリンFc領域は、使用され得る。

【0048】

本発明の実行において有用であるヒト免疫グロブリンFc領域をコードする核酸配列、およびヒト免疫グロブリンFc領域を規定するアミノ酸配列は、配列番号3および配列番号4に示される。しかし、本発明の実行において有用である他の免疫グロブリンFc領域配列が、例えばヌクレオチド配列によってコードされる配列によって見出され得ることが、意図される。このヌクレオチド配列は、Genbankおよび/またはEMBLデータベース（例えばAF045536.1 (*Macaca fucicularis*)、AF045537.1 (*Macaca mulatta*)、AB016710 (*Felix catus*)、K00752 (*Oryctolagus cuniculus*)、U03780 (*Sus scrofa*)、Z48947 (*Camelus dromedarius*)、X62916 (*Bos taurus*)、L07789 (*Mustela vison*)、X69797 (*Ovis aries*)、U17066 (*Cricetulus migratorius*)、X07189 (*Rattus rattus*)、AF57619.1 (*Trichosurus vulpecula*) またはAF035195 (*Monodelphis domest*

i c a))に開示される(これらの開示は、本明細書中で参考として援用される)。

【0049】

さらに、免疫グロブリン重鎖定常領域内のアミノ酸の置換または欠失が、本発明の実行に有用であり得ることが意図される。1例は、上部CH2領域にアミノ酸置換基を導入し、Fcレセプターに対して減少された親和性を有するFc改変体を作製する工程を包含し得る(Coleら(1997) J. IMMUNOL. 159:3613)。当業者は、周知の分子生物学的技術を使用してこのような構築物を調製し得る。

【0050】

Fc領域配列としてのヒトFcγ1の使用は、いくつかの利点を有する。例えば、Fc融合タンパク質がバイオ製薬(biopharmaceutical)として使用される場合、Fcγ1ドメインは、融合タンパク質にエフェクター機能活性を与え得る。エフェクター機能活性は、生物学的活性(例えば、胎盤転移および増加した血清の半減期)を含む。免疫グロブリンFc領域はまた、抗FcELISAによる検出およびStaphylococcus aureusタンパク質A(「タンパク質A」)への結合を介した精製のために提供する。しかし、特定の適用において、免疫グロブリンFc領域から特定のエフェクター機能(例えば、Fcレセプター結合および/または相補結合)を欠失することが所望され得る。

【0051】

本発明が、従来の組換えDNA方法論を開発し、本発明の実行におけるFc融合タンパク質を産生することが理解される。Fc融合構築物は、好ましくはDNAレベルで産生され、そして得られたDNA発現ベクターは組み込まれ、そして本発明の融合タンパク質を産生するために発現される。本明細書中で使用される場合、用語「ベクター」は、ヌクレオチド配列を含む任意の核酸を意味すると理解される。このベクターは、宿主細胞に組み込まれ得、そして宿主細胞ゲノムに再結合し、かつ宿主細胞ゲノムに組み込まれるか、またはエピソームとして自立的に複製する。このようなベクターとしては、直鎖状核酸、プラスミド、ファー

ジミド、コスミド、RNAベクター、ウイルスベクターなどが挙げられる。ウイルスベクターの非限定的な例としては、レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスが挙げられる。本明細書中で使用される場合、用語標的タンパク質の「遺伝子発現」または「発現」は、DNA配列の転写、mRNA転写物の翻訳、およびFc融合タンパク質産物の分泌を意味すると理解される。

【0052】

有用な発現ベクターは、pdCsであり(Loら、(1988) PROTEIN ENGINEERING 11:495)、ここでFc-X遺伝子の転写は、ヒトサイトメガロウイルスのエンハンサー/プロモーターおよびSV40ポリアデニル化シグナルを利用する。使用されたヒトサイトメガロウイルスのエンハンサーおよびプロモーターは、Boshartら(1985) CELL 41:521に提供される配列のヌクレオチド-604~+7に由来した。ベクターはまた、選択マーカーとして変異ジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子を含む(SimonsenおよびLevinson(1983) PROC. NAT. ACAD. SCI. USA 80:2495)。

【0053】

適切な宿主細胞は、本発明のDNA配列で形質転換され得るか、またはトランスフェクトされ得、そして標的タンパク質の発現および/または分泌に使用され得る。現在、本発明の使用に好ましい宿主細胞としては、不死ハイブリドーマ細胞、NS/Oミエローマ細胞、293細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞、HELA細胞、およびCOS細胞が挙げられる。

【0054】

哺乳動物細胞において融合タンパク質の高レベルの発現を産生するために使用された1つの発現系は、5'→3'の方向で、分泌カセットをコードするDNA構築物であり、シグナル配列および免疫グロブリンFc領域、および標的タンパク質を含む。いくつかの標的タンパク質は、このような系で首尾よくに発現され、そして例えば、IL2、CD26、Tat、Rev、OSF-2、βIG-H3、IgEレセプター、PSMA、およびgp120を含む。これらの発現構築物は、Loらの米国特許第5,541,087号および第5,726,044号

に記載される。

【0055】

本明細書において使用されるように、用語「シグナル配列」は、インターフェロン- α 融合タンパク質の分泌を指向し、そしてその後、宿主細胞中で翻訳された後に切断されるセグメントを意味することが理解される。本発明のシグナル配列は、小胞体の膜を通過するタンパク質の輸送を惹起する、アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドである。本発明において有用なシグナル配列としては、抗体軽鎖シグナル配列（例えば、抗体14.18（Gilliesら（1989）J. IMMUNOL. METH. 125:191））、抗体重鎖シグナル配列（例えば、MOPC141抗体重鎖シグナル配列（Sakanoら（1980）NATURE 286:5774））、および当該分野で公知である任意の他のシグナル配列（例えば、Watson（1984）NUCLEIC ACIDS RESEARCH 12:5145を参照のこと）が挙げられる。

【0056】

シグナル配列は、当該分野で十分特徴付けられており、代表的に16～30個のアミノ酸残基を有することが公知であり、そしてそれより大きいか、または小さいアミノ酸残基を含み得る。代表的なシグナルペプチドは、3つの領域からなる：塩基性N末端領域、中心疎水性領域、および極性のより高いC末端領域。中心疎水性領域は、4～12個の疎水性残基を有し、この残基は、新生ポリペプチドの輸送の際に、膜脂質二重層中にシグナルペプチドを固定させる。惹起後に、このシグナルペプチドは、シグナルペプチダーゼとして公知の細胞性酵素によって、小胞体のルーメンで一般に切断される。シグナルペプチドの潜在的切断部位は、「(-3, -1)ルール」に一般に従う。従って、代表的なシグナルペプチドは、-1および-3の位置に小さな中性アミノ酸残基を有し、かつこの領域にプロリン残基を有さない。このシグナルペプチダーゼは、例えば、-1アミノ酸と+1アミノ酸との間のシグナルペプチドを切断する。従って、このシグナル配列は、分泌の間に、融合タンパク質のアミノ末端から切断され得る。結果として、これは、免疫グロブリンFc領域および標的タンパク質からなるFc融合タンパク質の分泌を生じる。シグナルペプチド配列の詳細な議論は、von He

ijne (1989) NUCLEIC ACIDS RES. 14:4683から提供される。

【0057】

当業者に明らかであるように、分泌カセットに使用する特定のシグナル配列の適合性は、いくつかの慣用実験方法を必要とし得る。このような実験方法は、Fc融合タンパク質の分泌を指向するシグナル配列の能力を決定する工程、およびFc融合タンパク質の効果的な分泌を達成するために使用される、配列の最適なコンフィギュレーション、ゲノムまたはcDNAの決定を包含する。さらに、当業者は、上記のvon Heijneによって示される規則に従って合成シグナルペプチドを生成し、そして慣用実験方法によって、このような合成シグナル配列の効果について試験し得る。シグナル配列はまた、「シグナルペプチド」、「リーダー配列」または「リーダーペプチド」として言及され得る。

【0058】

シグナル配列と免疫グロブリンFc領域との融合は、時折、分泌カセットとして本明細書中で言及される。本発明の実施において有用である例示的な分泌カセットは、5'→3'方向に免疫グロブリン軽鎖遺伝子およびヒト免疫グロブリンγ1遺伝子のFcγ1領域のシグナル配列をコードするポリヌクレオチドである。免疫グロブリンFcγ1遺伝子のFcγ1領域は、好ましくは、免疫グロブリンヒンジドメインおよび少なくともCH3ドメインの少なくとも一部分を含み、またはより好ましくは、ヒンジドメイン、CH2ドメインおよびCH3ドメインの少なくとも一部分を含む。本明細書で使用されるように、免疫グロブリンヒンジ領域の「一部分」は、鎖間ジスルフィド結合を形成し得る少なくとも1個、好ましくは2個のシステイン残基を含む、免疫グロブリンヒンジの一部分を意味すると理解される。この分泌カセットをコードするDNAは、ゲノムコンフィギュレーションまたはそのcDNAコンフィギュレーションに存在し得る。特定の環境の下、ヒト免疫グロブリンFcγ2重鎖配列由来のFc領域を産生することは、利点があり得る。ヒト免疫グロブリンγ1およびγ2配列に基づくFc融合は、マウスにおいて同様に振舞うが、γ2配列に基づくFc融合は、ヒトにおいて優れた薬物速度を示し得る。

【0059】

別の実施形態において、DNA配列は、分泌カセットと標的タンパク質との間に挿入されるタンパク分解性切断部位をコードする。切断部位は、コード化融合タンパク質のタンパク分解、続く標的タンパク質からのFcドメインの分離を提供する。本明細書において使用されるように、「タンパク分解性切断部位」は、タンパク分解性酵素または他のタンパク分解性切断試薬により、好ましくは切断されるアミノ酸配列を意味すると理解される。有用なタンパク分解性切断部位は、トリプシン、プラスミンまたはエンテロキナーゼKのようなタンパク分解酵素によって認識されるアミノ酸配列を含む。多くの切断部位/切断試薬対は、公知である（例えば、米国特許第5,726,044号を参照のこと）。

【0060】

さらに、これらの定常領域の構造の置換または欠失が有用であり、ここで、定常領域ドメインの1以上のアミノ酸残基が置換されるかまたは欠失される。1例として、上流CH2領域でのアミノ酸置換により、Fcレセプターに対して減少したアフィニティーを有するFc改変体が産生される（Coleら（1997）J. IMMUNOL. 159:3613）。当業者は、周知の分子生物学的技術を使用してこのような構築物を調製し得る。

【0061】

本明細書において開示される実施例において、高いレベルのFc-インターフェロン- α が産生された。初期クローンによって約50 μ g/mLのFc-インターフェロン- α が産生され、これは、タンパク質Aアフィニティークロマトグラフィーによって容易に均一となるまで精製され得る。発現レベルは、しばしば、サブクローニングによって数倍増加され得る。上記のように、インターフェロン- α がFc融合分子として発現される場合、高レベルの発現が得られることが見出される。おそらくFcタンパク質がキャリアとして作用し、ポリペプチドがC末端で正しく折り畳まれ、効果的に分泌されるのを助けるからである。さらに、Fc領域はグルコシル化され、そして生理学的pHが大きく変化し、従って、Fc領域が疎水性タンパク質を可溶化するのを助け得る。

【0062】

高レベルの発現に加えて、インターフェロン- α 融合タンパク質は、インターフェロンのみと比較して、部分的にそれらの長い分子サイズに起因した血清のより長い半減期を示した。例えば、半減期が2～5時間であるインターフェロン- α (PHYSICIANS DESK REFERENCE, 第50版、1996:2156-2147および2364-2373)と比較して、Fc-インターフェロン- α は、マウスにおいて19.3時間の循環半減期を有する(実施例6を参照のこと)。約19 kDの分子量を有するインターフェロン- α は、腎臓濾過によって効果的に洗浄するのに十分小さい。これに対して、Fc-インターフェロン- α は、約100 kDの分子量を有する。なぜならば、各Fc分子に結合する2個のインターフェロン- α 部分(すなわち、Fcはダイマー形態であるので、2個のインターフェロン- α)が存在するからである。このようなダイマー構造が、インターフェロン- α レセプターに対してより高い結合親和性を示し得る。インターフェロン- α 活性は、レセプターにより媒介されるので、この二価のインターフェロン- α 融合タンパク質は、可能性としてインターフェロン- α 自体よりもより有効である。

【0063】

さらに、多くのタンパク質リガンドは、ダイマーとしてそれらのリガンドに結合することが公知である。インターフェロン- α は、弱い二量体化定数を有するタンパク質リガンドのクラスに属するので、インターフェロン- α 上のFcによって与えられる物理学的束縛により、二量体化を分子内プロセスとさせ、ダイマーの方に平衡をシフトさせ、そしてレセプターへの結合を増強する。システイン残基がまた、標準的な組換えDNA技術によってモノマーに適切な位置で導入され得、ジスルフィド共有結合の形成によりダイマーを安定化させる。

【0064】

本発明の融合タンパク質は、いくつかの重要な臨床的な利点を提供する。Daudi細胞における生物学的活性の試験および細胞変性効果アッセイについての試験で立証されるように(実施例4)、Fc-インターフェロン- α の生物学的な活性は、インターフェロン- α の活性よりも有意に高い。

【0065】

本発明の別の実施形態において、種々の構造的コンホメーション（例えば、二価または多価の構築物、二量体または多量体の構築物、およびそれらの組み合わせ）を有する構築物が提供される。このような本発明の分子の機能性コンホメーションにより、インターフェロン- α ならびに他の抗ウイルス性タンパク質および抗癌性タンパク質を、動物モデルにおいて調査し得る。

【0066】

本発明の重要な局面は、種々のインターフェロン- α タンパク質およびコードDNAの配列および特性が極めて類似しているということである。Fc-X融合の状況において、インターフェロン- α タンパク質およびコードDNAの特性は、本質的に同一であり、その結果、治療の目的のために、一連の共通の技術を使用して任意のFcインターフェロン- α DNA融合タンパク質を産生し、融合タンパク質を発現し、融合タンパク質を精製し、そして融合タンパク質を投与し得る。

【0067】

本発明はまた、Fc融合タンパク質として非ヒト種のインターフェロン- α を産生するための方法を提供する。非ヒトインターフェロン- α タンパク質は、インターフェロン- α の臨床前研究に有用である。なぜならば、タンパク質薬物の効果および毒性の研究は、ヒトで試験する前に動物モデル系で実施しなければならないからである。ヒトタンパク質は、マウスモデルで作用し得ない。なぜならば、タンパク質は、免疫応答を誘発し、そして／または試験結果をゆがめる異なった薬物速度を示し得るからである。従って、等価なマウスタンパク質は、マウスモデルで試験するためのヒトタンパク質の最良の代替物である。

【0068】

本発明は、本発明のDNA、RNA、またはタンパク質を、種々の癌、ウイルス性疾患、他の疾患、関連する状態およびその原因を有する哺乳動物に投与することによって、このような状態を処置する方法を提供する。関連する状態としては、B型肝炎、C型肝炎、D型肝炎、性器いぼ、ヘアリーセル白血病、AIDS関連カポジ肉腫、黒色腫、前立腺癌およびウイルス性疾患および癌の他の形態が挙げられるが、これらに限定されない。免疫応答を調節する際に、インターフ

エロン α によって成される幅広い役割の観点において、本発明はまた、インターフェロン α の投与によって緩和される状態を処理する方法を提供する。これらの方法は、ウイルス感染または癌に直接関係し得るかまたはし得ない状態を有する哺乳動物に、本発明の組成物の有効量を投与する工程を包含する。

【0069】

本発明のタンパク質は、治療薬剤として有用であるだけでなく、このタンパク質が診断用途のための抗体の産生に有用であることが当業者に認識される。同様に、DNAまたはRNA（例えば、ベクターまたはこのような使用のための他の送達系）の適切な投与は、本発明の使用方法に含まれる。

【0070】

免疫グロブリンFcを含む融合タンパク質としての、Fcインターフェロン α は、非常に好都合な組織分布およびわずかに異なる作用モードを有し、そして特に血清の長い半減期および投与され得る多量の用量の可溶性タンパク質の観点で、臨床的效果を達成する。特に、肝臓に高レベルのFc γ レセプターが存在し、これはB型肝炎およびD型肝炎を引き起こすウイルスによる感染部位である。インターフェロン α の神経学的な副作用は、血液脳関門を通過し得る小さなサイズのインターフェロン α のために生じると考えられる。より大きなサイズのFcインターフェロン α は、このタンパク質が血液脳関門を通過する範囲を有意に減少させる。

【0071】

本発明の組成物は、特定の分子と適合性である任意の経路によって投与され得る。本発明の組成物が、直接的に（例えば、注射、移植または組織部位への局所的投与によるように局所的に）または全身的に（例えば、非経口的または経口的に）任意の適切な手段によって動物に提供され得る。この組成物は、非経口的（例えば、静脈内、皮下、眼、腹腔内、筋肉内、頬、直腸、膺、眼窩内、大脳内、頭蓋内、脊髄内、脳室内、硬膜下腔内、槽内、嚢内、鼻腔内、またはエアロゾル投与）に投与される場合、この組成物は、好ましくは、水性または生理学的に適合性の流体懸濁物または液体の一部を含む。従って、このキャリアまたはビヒクルは、生理学的に受容可能であり、その結果、患者へ所望の組成物を送達するこ

とに加えて、患者の電解質および／または容積バランスに他に不利な影響を与えない。従って、この試薬に対する流体媒体は、正常な生理学的な生理食塩水を含み得る。

【0072】

本発明のDNA構築物（または遺伝子構築物）はまた、遺伝子治療のプロトコールの一部として使用され得、インターフェロン α またはその融合タンパク質構築物をコードする核酸を送達する。本発明は、特定の細胞型において、インビボトランスフェクションのための発現ベクターおよびインターフェロン α またはその融合タンパク質構築物の発現を特徴とし、インターフェロン α の機能を再構築または補充する。インターフェロン α の発現構築物、またはその融合タンパク質構築物は、任意の生物学的に有効なキャリア（例えば、インターフェロン α 遺伝子またはその融合タンパク質構築物をインビボで細胞に有効に送達し得る、任意の処方物または組成物）で投与され得る。アプローチとしては、組換えレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、および単純ヘルペスウイルス1、または組換えバクテリアプラスミドもしくは真核生物プラスドを含むウイルス性ベクターへの被験体遺伝子の挿入を含む。本発明の融合タンパク質をコードする核酸の1回の投薬当たりの好ましい用量は、 $1\mu\text{g}/\text{m}^2 \sim 100\text{mg}/\text{m}^2$ 、より好ましくは、 $20\mu\text{g}/\text{m}^2 \sim 10\text{mg}/\text{m}^2$ 、そして最も好ましくは、 $400\mu\text{g}/\text{m}^2 \sim 4\text{mg}/\text{m}^2$ の範囲内である。最適な用量および投与モードが、当該分野の技術レベル内で、慣用的な実験により十分決定され得ることが考慮される。

【0073】

1回の投薬当たり好ましい融合タンパク質の用量は、 $0.1\text{mg}/\text{m}^2 \sim 100\text{mg}/\text{m}^2$ 、より好ましくは、 $1\text{mg}/\text{m}^2 \sim 20\text{mg}/\text{m}^2$ 、そして最も好ましくは、 $2\text{mg}/\text{m}^2 \sim 6\text{mg}/\text{m}^2$ の範囲内である。しかし、最適な用量はまた、処置される疾患および副作用の存在で左右されることが考慮される。しかし、最適な用量は、慣用的な実験を使用して決定され得る。融合タンパク質の投与は、周期的なボース注射によるか、または外部レザバ（例えば、静脈内バックから）からもしくは内部レザバ（例えば、生分解性移植片）から連続的な静脈内投

与または腹腔内投与によってである。さらに、本発明の融合タンパク質はまた、意図されるレシピエントに複数の異なる生物学的に活性な分子と一緒に投与し得ることが考慮される。しかし、融合タンパク質と他の分子、投薬モード、用量の最適な組み合わせが、当該分野の技術レベル内で、慣用的な実験によって十分決定され得ることが考慮される。

【0074】

本発明は、以下の非制限的な例によってさらに例示される。

【0075】

(実施例)

(実施例1. huFc-huインターフェロン- α (huFc-IFN- α)
の発現)

mRNAをヒト末梢血単核細胞から調製し、そして逆転写酵素を用いて逆転写した。得られたcDNAをポリメラーゼ連鎖反応(PCR)のためのテンプレートとして使用して、huFc-インターフェロン- α (huFc-IFN- α)融合タンパク質として、発現のためのヒトインターフェロン- α cDNAをクローニングおよび適合した。順方向プライマーは、

【0076】

【化1】

5' C CCG GGT AAA TGT GAT CTG CCT CAG AC (SEQ ID NO: 5)

であり、ここで、配列CCCGGG(XmaI制限酵素認識部位)TAAAは、免疫グロブリン重鎖のカルボキシ末端をコードし、続いて、インターフェロン- α のN末端をコードする配列(太字)が続く。逆方向プライマーは、

【0077】

【化2】

5' CTC GAG TCA ATC CTT CCT CCT TAA TC (SEQ ID NO: 6)

であり、これは、その翻訳終止コドン（アンチコドン、TCA）を有するインターフェロン- α のカルボキシ末端配列（アンチセンス）をコードし、そしてこれは次いで、XhoI部位（CTCGAG）が続く。A517塩基対PCR産物をクローン化しそして配列決定した。配列分析により、PCR産物が、発現に適した成熟ヒトインターフェロン- α （すなわち、5'末端にXmaI、3'末端にXhoI部位を有する）をコードすることを確認した。

【0078】

発現ベクターpdcshuFc-IFN- α を以下のようにして構築した。Loら（1998）Protein Engineering 11:495に従って、ヒトインターフェロン- α cDNAを含むXmaI-XhoI制限フラグメントをpdcshuFcベクターのXmaI-XhoIフラグメントに結合した。huFcは、ヒト免疫グロブリン γ 1のFcフラグメントである。得られたベクター、pdcshuFc-IFN- α を使用して、huFc-IFN- α の発現のために哺乳動物細胞をトランスフェクトした。

【0079】

（実施例2．タンパク質のトランスフェクションおよび発現）

一過性トランスフェクションのために、リン酸カルシウムを用いてプラスミドDNAを共沈することによって（Sambrookら編（1989）「MOLECULAR CLONING—A LABORATORY MANUAL」、Cold Spring Harbor Press, NY）、または製造業者の指示に従って、Lipofectamine Plus（Life Technologies, Gaithersburg, MD）を使用してリポフェクションすることによって、プラスミドpdcshuFc-IFN- α をヒト腎臓293細胞に導入した。

【0080】

安定にトランスフェクトされたクローンを得るために、プラスミドDNAを、エレクトロポレーションによって、マウス骨髄腫NS/O細胞に導入した。簡潔には、NS/O細胞を、10%ウシ胎児血清、2mMグルタミンおよびペニシリン/ストレプトマイシンを補充したダルベッコ改変イーグル培地中で増殖させた

。約 5×10^6 個の細胞をリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)で一回洗浄し、そして0.5 mLのPBSに再懸濁した。次いで、その細胞と共に $10 \mu\text{g}$ の直線化プラスミドDNAを、氷上で10分間、Gene Pulser Cuvette (電極間隔0.4 cm、BioRad) 中でインキュベートした。0.25 Vおよび $500 \mu\text{F}$ に設定したGene Pulser (BioRad、Heracles、CA) を使用して、エレクトロポレーションを行った。細胞を氷上で10分間回復させ、その後、それらの細胞を増殖培地に再懸濁し、次いで2つの96ウェルプレートにプレートした。 100 nM メトトレキサート(MTX)の存在下で増殖させることにより、安定にトランスフェクトされたクローンを選択し、これをトランスフェクションの2日後に導入した。2~3回以上については、細胞を3日毎に供給し、そしてMTX耐性クローンが、2~3週間で現れた。クローンの上清を、抗FcELISA (実施例3を参照のこと) によってアッセイして、高い産生物を同定した。高度に産生するクローンを単離し、そして 100 nM MTXを含む増殖培地中で増殖させた。

【0081】

ゲル電気泳動により特徴付けられるルーチンについて、馴化培地中のFc融合タンパク質を、Protein A Sepharose (Repligen、Cambridge、MA) に結合し、次いで、2-メルカプトエタノールと共にか、または2-メルカプトエタノールなしで、標準タンパク質サンプル緩衝液中で沸騰することにより、このProtein A Sepharoseから溶離した。ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で電気泳動した後、Coomassieブルーで染色することによって、タンパク質のバンドを可視化した。SDS-PAGEによると、huFc-huインターフェロン- α は、約52 kDの見かけのMWを有していた。

【0082】

精製のために、Protein A Sepharoseの融合タンパク質のバンドを、リン酸ナトリウム緩衝液(100 mM NaH_2PO_4 、pH3、および 150 mM NaCl) 中で溶離した。ついで、この溶離液を、すぐに、0.1容量の2M トリシューム塩酸塩で、pH8に中和した。

【0083】

(実施例3. ELISA手順)

MTX耐性クローンおよび他の試験サンプルの懸濁液中のヒトFc含有タンパク質産物の濃度を、抗huFcELISAによって決定した。この手順を以下に詳細に記載する。

【0084】

(A. プレートのコーティング)

ELISAプレートを、AffiniPure ヤギ抗ヒトIgG (H+L) (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA) で、PBS中5 μ g/mL、および90ウェルプレート (Nunc-Immuno plate Maxisorp) 中100 μ L/ウェルで、コーティングした。コーティングしたプレートをカバーし、そして4℃で一晩インキュベートした。次いで、プレートを、PBS中0.05%のTween (Tween 20) で4回洗浄し、そしてPBS中1% BSA/1%ヤギ血清、200 μ L/ウェルでブロックした。ブロック緩衝液と共に37℃で2時間インキュベートした後、このプレートを、PBS中0.05%のTweenで4回洗浄し、そしてペーパータオル上でたたいて乾燥させた。

【0085】

(B. 試験サンプルおよび二次抗体を用いるインキュベーション)

試験サンプルを、サンプル緩衝液 (PBS中1% BSA/1%ヤギ血清/0.05% Tween) 中で適切のように希釈した。既知の濃度のキメラ抗体 (ヒトFcを有する) を使用して、標準曲線を作成した。標準曲線を作成するために、サンプル緩衝液で段階希釈を行って、125 ng/mL ~ 3.9 ng/mL の範囲の標準曲線を得た。この希釈サンプルおよび標準物を、100 μ L/ウェルでプレートに添加し、そしてこのプレートを37℃で2時間インキュベートした。インキュベーション後、このプレートを、PBS中0.05%のTweenで8回洗浄した。次いで、各ウェルに、サンプル緩衝液中で約1:120,000に希釈した100 μ Lの二次抗体、ホースラディッシュペルオキシダーゼ結合抗ヒトIgG (Jackson Immuno Research) を添加した。二

次抗体の正確な希釈は、多くのHRP結合抗ヒトIgGの各々について決定されなければならない。37℃で2時間インキュベートした後、プレートに、PBS中0.05%のTweenで8回洗浄した。

【0086】

(C. 発色)

基質溶液を、100 μ L/ウェルでプレートに添加した。この基質溶液は、30mgのOPD (o-フェニレンジアミンジヒドロクロリド (OPD)) (1錠剤)を15mLの0.025Mクエン酸/0.05M Na₂HPO₄緩衝液 (pH 5) (これは、0.03%の新たに添加した過酸化水素を含む)に溶解することによって調製した。色を、暗闇で30分間室温で発色させた。発色時間は、ロットによって、様々な被覆プレート、二次抗体などに基づいて変化させた。4N硫酸を、100 μ L/ウェルで添加することにより反応を停止した。このプレートをプレートリーダー (これは、490および650nmに設定され、そして490nmにおけるODから650nmにおけるバックグラウンドODを引くようにプログラミングされる)で読みとった。

【0087】

(実施例4. バイオアッセイ)

2つの異なるアッセイを使用して、huFc-huIFN- α の生物活性を、ヒトインターフェロン- α (hu-IFN- α) ヒト白血球インターフェロン (Sigma, St. Louis, MO) の生物活性と比較した。第1のアッセイは、Daudiヒトリンパ芽球腫B細胞株 (ATCC CCL 213) の増殖の阻害を決定する。第2のアッセイは、ヒト肺癌A549細胞株 (ATCC CCL 185) に対する脳心筋炎ウイルス (EMCV) の細胞変性効果の阻害を測定する。

【0088】

インターフェロン- α は、Daudi (ヒトBurkettリンパ腫) 細胞の増殖を阻害する。Daudi細胞を、血清を含まないRPMI 1640で2回洗浄し、RPMI 1640および20%熱不活化 (56℃) ウシ胎児血清からなる増殖培地に再懸濁した。ついで、この細胞を、異なる濃度の α IFH (2.

1×10^6 IU/mg) および huFc-huIFN- α の存在下、24 ウェルプレートに、 1×10^5 細胞/mL/ウェルでプレートした。3~4日後、huFc-huIFN- α の形態の 50 pg/mL の IFN- α が、Daudi 細胞増加の 50~100% 阻害を達成する 750 pg/mL の huIFN- α と同じ程度に有効であることが見出された。コントロールとして、インターフェロニー (Pharmingen, San Diego, CA) は、このアッセイにおいて、100 ng/mL で、活性を示さなかった。これは、阻害がインターフェロニー α 特異性であることを示す。

【0089】

(実施例 5. 抗ウイルス活性の測定)

細胞培養におけるウイルスの複製は、しばしば、細胞毒性 (細胞変性効果 (CPE) として公知の効果) を生じる。インターフェロンは、細胞培養における抗ウイルス状態を誘導し、そしてこのような CPE から細胞を保護し得る。抗ウイルス活性 IFN- α は、「Lymphokines and Interferons: A Practical Approach」、M. J. Clements, A. G. Morris および A. J. H. Gearing 編、I. R. L. Press, Oxford, 1987 に記載されるように、細胞変性効果減少 (CPE_R) アッセイによって定量され得る。huFc-huIFN- α および huIFN- α の抗ウイルス活性を、ヒト肺癌細胞株 A549 (ATCC CCL185) および脳心筋炎ウイルス (ATCC VR 129B) を使用して、上記の参考文献に記載される CPE_R プロトコルに従って比較した。50% CPE_R (すなわち、50% 保護) を与える有効用量は、huFc-huIFN- α について 570 pg/mL (IFN- α の量に基づいて) であり、huIFN- α について 500 pg/mL であることが見出された。従って、huFc-huIFN- α における IFN- α および huIFN- α は、実質的に等価な抗ウイルス活性を有する。

【0090】

(実施例 6. 薬物速度論)

huFc-huIFN- α の薬物速度を、4 Balb/c のマウスの群におい

て決定した。25mgのhuFc-huIFN- α を、各マウスの尾静脈に注射した。血液を、注射の直後(すなわち、 $t=0$ 分)、および注射の0、5、1、2、4、8および24時間後に眼窩後出血によって得た。血液サンプルを、凝固を防ぐために、ヘパリンの入った管に収集した。細胞を、Eppendorf高速微小遠心分離で4分間、遠心分離することによって除去した。血漿中のhuFc-huIFN- α の濃度を、抗huFcELISAおよび抗huFc抗体を用いるウエスタンブロット分析によって測定し、これはまた、huFc-huIFN- α が循環においてインタクトなままであることを示した(huFc-huIFN- α について52kD)。分解産物(huFcについて32kDのバンド)は、検出し得なかった。huFc-huIFN- α の循環半減期は、19.3時間と決定され、これは、約2~5時間のヒトIFN- α の報告された循環半減期(PHYSICIANS DESK REFERENCE, 第50版、1996:2145~2147および2364~2373)より有意に長い。

【0091】

(実施例7. SCIDマウスにおけるヒトパーキットリンパ腫の播種性増殖の処置)

Daudi (ヒトパーキットリンパ腫)細胞を、播種性腫瘍としてC. B-17 SCID (重篤複合免疫不全) マウスにおいて増殖した(Ghetieら、(1990) INTL. J. CANCER:45:481)。0.2mL PBS B中約 5×10^6 個のDaudi細胞の単細胞懸濁液を、6~8週齢のSCIDマウスに静脈内注射した。3日後、マウスを、8匹の3グループに無作為化し、そして0.2mLのPBS、PBS中30 μ gのhuFc-huIFN- α (約12 μ gのIFN- α を含む)、またはPBS中60 μ gのhuFc-huIFN- α を毎日腹腔内注射した。その結果を図2に示す。

【0092】

Daudi細胞の注射の28日後まで、コントロールPBS (菱形) グループの全てのマウスは、後ろ脚の麻痺を発症した。このPBSコントロールグループのマウスは、38日目に死亡し始め、そして61日までに、このコントロールグループの全てのマウスが死亡した。逆に、処置グループのマウスは、より長く

、かつ用量依存性様式で、生存した。30 μ gのhuFc-huIFN- α を受けたグループ(×印)について、第1の死亡は70日目に起こり、そして全てのマウスが134日までに死亡した。60 μ gのhuFc-huIFN- α を受けたグループ(三角)について、第1の死亡は126日目まで起こらず、そして4匹が153日目に死亡した。残りのマウスは病気で、安楽死させた。

【0093】

(実施例8. SCIDマウスにおけるヒトバーカトリン腫瘍の局局性増殖の処置)

このモデルにおいて、Daudi細胞を、皮下腫瘍としてC. B-17 SCIDマウスにおいて増殖した(Ghetieら、(1990) INT. J. CANCER: 45~481)。0.1 mL PBS中約 6×10^6 個のDaudi細胞の単細胞懸濁液を、6~8週齢のSCIDマウスに皮下注射した。腫瘍サイズが200~400 mm³に達すると(これは、約4週間かかった)、処置を始めた。マウスを8匹の3グループに無作為化し、そして各グループに、0.2 mLのPBS、PBS中30 μ gのhuFc-huIFN- α 、またはPBS中60 μ gのhuFc-huIFN- α を一日6回腹腔内注射した。その結果を図3に示す。腫瘍のサイズは、1週間に2回測定した。

【0094】

コントロールグループのマウスの腫瘍(菱形)は、35日目までに、5602 mm³の平均容積(範囲: 4343~6566 mm³)まで迅速に増殖し、その後、このグループの全てのマウスを安楽死させた。対照的に、処置グループのマウスの腫瘍の増殖は、用量依存性様式で抑制された。30 μ gおよび60 μ gのhuFc-huIFN- α を受けたグループは、35日目で、それぞれ、214および170 mm³の平均腫瘍容積を有し、これは、処置前の268および267 mm³より小さかった。実際に、30 μ gのhuFc-huIFN- α を受けたグループの8匹のうち5匹、および60 μ gのhuFc-huIFN- α を受けたグループの8匹のうち4匹において、皮下腫瘍が完全に収縮した。しかし、さらに処置を行わない場合、いくつかの腫瘍は回復し、そして増殖した。それにもかかわらず、このグループの2匹のマウスは、実験が終了した205日まで、腫

瘍を有さないままであった。

【0095】

(実施例9. Fc-インターフェロン- α による肝疾患の処置)

肝疾患(例えば、肝炎または肝転移)は、インターフェロン- α またはインターフェロン- α -Fcより、Fc-インターフェロン- α でより有効に処置され得ると考えられる。

【0096】

例えば、Fc-インターフェロン- α は、腫瘍細胞が肝臓に転移しているマウスモデルを処置する際に有効であり得ると考えられる。手術の約5分前に、0.2 mlのPBS中、80 mg/kgのケタミンおよび5 mg/kgのキシラジンを腹腔内注射することによって、マウスを麻酔する。次いで、無菌性を保証するために、層流フード中で以下の工程を行う。各マウスの皮膚を、ベタジン(betadine)およびエタノールで清潔にし、そして補充されていない100 μ lのRPMI 1640培地中の腫瘍細胞(例えば、Daudi細胞)を、27ゲージ針を使用して、1分間掛けて、脾臓の下に注射した。2分後、脾臓を、4.0シルク縫合糸で結紮し、そして脾臓を取り出した。

【0097】

いくつかの細胞は、注射部位から肝臓に運ばれ、ここでこれらの細胞は転移性腫瘍を形成し得る。次いで、転移性肝腫瘍を有するマウスをFc-インターフェロン- α で処置する。Fc-インターフェロン- α で処置したマウスは、等モル量のインターフェロン- α またはインターフェロン- α -Fc融合タンパク質で処置したマウスに比べて、腫瘍増殖の有意な減少を示すと考えられる。

【0098】

さらに、Fc-インターフェロン- α の特定の効果は、Fc-インターフェロン- α が濃縮されていない他の組織に局在化する障害の処置における効果より、肝疾患の処置においてより明白であると考えられる。

【0099】

(等価物)

本発明は、その精神または本質的な特徴から逸脱することなく、他の特定の形

態で具現化され得る。従って、上記の実施例は、本明細書中に記載される本発明の限定ではなく、全ての例示の観点において考慮される。従って、本発明の範囲は、上記の説明よりむしろ添付の特許請求の範囲により示され、従って、特許請求の範囲と等しい意味および範囲内となる全ての変更がここに包含されることが意図される。

【0100】

(参考文献の援用)

本明細書中上記で参考とされる科学の論文および特許文献の各々の開示は、本明細書中で参考として援用される。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1A～1Cは、本発明に従って構築された融合タンパク質の非限定的な例の概略図である。

【図2】

図2は、Daudi細胞の懸濁物を注射し、次いでhuFc-huIFN α で処置したSCIDマウスの群についての生存曲線を示すグラフである。0日目に、マウスに、Daudi細胞を注射した。3～8日目に、8匹のマウスの群にPBS（ひし形）、30 μ gのhuFc-huIFN- α （十字形）、または60 μ gのhuFc-huIFN- α （三角形）を注射した。

【図3】

図3は、huFc-huIFN α で処置したSCIDマウスにおけるDaudi細胞の皮下腫瘍の増殖速度を示すグラフである。処置の約4週間前に、マウスにDaudi細胞を皮下注射した。注射したDaudi細胞が、増殖して200～400mm³の腫瘍を形成した時点で、マウスを8匹の群に分類し、そして6日間、PBS（ひし形）、PBS中の30 μ gのhuFc-huIFN- α （四角形）、またはPBS中の60 μ gのhuFc-huIFN- α （三角形）の注射で処置した。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Lo, Kin-Ming
Sun, Yaping
Gillies, Stephen D.
Lexigen Pharmaceuticals Corp.

<120> Expression and Export of Interferon-Alpha Proteins as
Fc Fusion Proteins

<130> LEX-009 PC

<140>
<141>

<150> US 60/134,895
<151> 1999-05-19

<160> 29

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
<211> 498
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(498)
<223> Human IFN alpha DNA sequence

<400> 1
tgt gat ctg cct cag acc cac agc ctg ggt aat agg agg gcc ttg ata 48
Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Asn Arg Arg Ala Leu Ile
1 5 10 15

ctc ctg gca caa atg gga aga atc tct cct ttc tcc tgc ctg aag gac 96
Leu Leu Ala Gln Met Gly Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30

aga cat gac ttt gga ttc ccc cag gag gag ttt gat ggc aac cag ttc 144
Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Asp Gly Asn Gln Phe
35 40 45

cag aag gct caa gcc atc cct gtc ctc cat gag atg atc cag cag acc 192
Gln Lys Ala Gln Ala Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Thr
50 55 60

ttc aat ctc ttc agc aca aag gac tca tct gct act tgg gaa cag agc 240
Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Thr Trp Glu Gln Ser
65 70 75 80

ctc cta gaa aaa ttt tcc act gaa ctt aac cag cag ctg aat gac ctg 288
Leu Leu Glu Lys Phe Ser Thr Glu Leu Asn Gln Gln Leu Asn Asp Leu
85 90 95

gaa gcc tgc gtg ata cag gag gtt ggg gtg gaa gag act ccc ctg atg 336
Glu Ala Cys Val Ile Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Thr Pro Leu Met
100 105 110

```

aat gtg gac tcc atc ctg gct gtg aag aaa tac ttc caa aga atc act 384
Asn Val Asp Ser Ile Leu Ala Val Lys Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
115 120 125

ctt tat ctg aca gag aag aaa tac agc cct tgt gcc tgg gag gtt gtc 432
Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
130 135 140

aga gca gaa atc atg aga tcc ttc tct tta tca aaa att ttt caa gaa 480
Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Lys Ile Phe Gln Glu
145 150 155 160

aga tta agg aag aag gat 498
Arg Leu Arg Lys Lys Asp
165

<210> 2
<211> 166
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Asn Arg Arg Ala Leu Ile
1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Gly Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Asp Gly Asn Gln Phe
35 40 45

Gln Lys Ala Gln Ala Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Thr
50 55 60

Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Thr Trp Glu Gln Ser
65 70 75 80

Leu Leu Glu Lys Phe Ser Thr Glu Leu Asn Gln Gln Leu Asn Asp Leu
85 90 95

Glu Ala Cys Val Ile Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Thr Pro Leu Met
100 105 110

Asn Val Asp Ser Ile Leu Ala Val Lys Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
115 120 125

Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
130 135 140

Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Lys Ile Phe Gln Glu
145 150 155 160

Arg Leu Arg Lys Lys Asp
165

<210> 3
<211> 696
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(696)
<223> Human Fc DNA sequence

<400> 3
gag ccc aaa tct tct gac aaa act cac aca tgc cca cgg tgc cca gca 48
Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc 96
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

aag gac acc ctc atg atc tcc ogg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg 144
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

gtg gac gtg age cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg 192
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag 240
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

tac aac agc acg tac ogt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag 288
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc 336
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc 384
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tca cgg gag gag atg acc 432
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
130 135 140

aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc 480
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac 528
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat 576
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190

agc aag ctc acc gtg gac aag agc agy tgg cag cag ggg aac gtc ttc 624
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag 672
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys

```

210 215 220 696

agc ctc tcc ctg tcc ccc ggt aaa
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

<210> 4
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

<210> 5
 <211> 27

<212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <223> Forward PCR primer

 <400> 5
 ccgggtaaa tgtgatctgc ctcagac 27

 <210> 6
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 6
 ctcgagtcac tctctctccc ttaatc 26

 <210> 7
 <211> 162
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <223> IFN alpha consensus sequence wherein, Xaa at any
 position besides positions 24,31,70 and 129
 represents any amino acid.

 <220>
 <223> Xaa24 can be Ile or Leu, Xaa31 can be Lys or Gln,
 Xaa70 can be Thr or Ser and Xaa 129 can be Leu or
 Val.

 <400> 7
 Cys Asp Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Xaa Xaa Met Xaa Xaa Xaa Ser Pro Xaa Xaa Cys Leu Xaa Xaa
 20 25 30
 Arg Xaa Asp Phe Xaa Xaa Pro Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Xaa
 35 40 45
 Xaa Xaa Xaa Gln Ala Xaa Xaa Val Leu Xaa Xaa Xaa Gln Gln Xaa
 50 55 60
 Xaa Xaa Leu Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Ala Xaa Trp Xaa Xaa Thr
 65 70 75 80
 Leu Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Gln Gln Leu Xaa Asp Leu
 85 90 95
 Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa
 100 105 110
 Xaa Val Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Val Xaa Xaa Tyr Phe Xaa Xaa Ile Xaa
 115 120 125
 Xaa Tyr Leu Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Ser Xaa Cys Ala Trp Glu Xaa Xaa
 130 135 140

Xaa Xaa Xaa Xaa Met Arg Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa
 145 150 155 160

Arg Leu

<210> 8

<211> 166

<212> FRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human IFN alpha-1 protein

<400> 8

Cys Asp Leu Pro Glu Thr His Ser Leu Asp Asn Arg Arg Thr Leu Met
 1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Ser Arg Ile Ser Pro Ser Ser Cys Leu Met Asp
 20 25 30

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Asp Gly Asn Gln Phe
 35 40 45

Gln Lys Ala Pro Ala Ile Ser Val Leu His Glu Leu Ile Gln Gln Ile
 50 55 60

Phe Asn Leu Phe Thr Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Asp
 65 70 75 80

Leu Leu Asp Lys Phe Cys Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu
 85 90 95

Glu Ala Cys Val Met Gln Glu Glu Arg Val Gly Glu Thr Pro Leu Met
 100 105 110

Asn Ala Asp Ser Ile Leu Ala Val Lys Lys Tyr Phe Arg Arg Ile Thr
 115 120 125

Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
 130 135 140

Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Leu Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu
 145 150 155 160

Arg Leu Arg Arg Lys Glu
 165

<210> 9

<211> 165

<212> FRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human IFN alpha-2 protein

<400> 9

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met

1	5	10	15
Leu Leu Ala Gln Met Arg Lys Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp	20	25	30
Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln	35	40	45
Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe	50	55	60
Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu	65	70	75
Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu	85	90	95
Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys	100	105	110
Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu	115	120	125
Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg	130	135	140
Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser	145	150	155
Leu Arg Ser Lys Glu	165		
<210> 10			
<211> 166			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<220>			
<223> Human IFN alpha-4 protein			
<400> 10			
Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Asn Arg Arg Ala Leu Ile	1	5	10
Leu Leu Ala Gln Met Gly Arg Ile Ser His Phe Ser Cys Leu Lys Asp	20	25	30
Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Glu Glu Glu Phe Asp Gly His Gln Phe	35	40	45
Gln Lys Thr Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Thr	50	55	60
Phe Asn Leu Phe Ser Thr Glu Asp Ser Ser Ala Ala Trp Glu Gln Ser	65	70	75
Leu Leu Glu Lys Phe Ser Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu	85	90	95
Glu Ala Cys Val Ile Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Thr Pro Leu Met			

100	105	110
Asn Val Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr 115	120	125
Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val 130	135	140
Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Leu Ser Phe Ser Thr Asn Leu Gln Lys 145	150	155
Arg Leu Arg Arg Lys Asp 165		

<210> 11
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Human IFN alpha-5 protein

<400> 11		
Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Ser Asn Arg Arg Thr Leu Met 1	5	10
Ile Met Ala Gln Met Gly Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Lys Asp 20	25	30
Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Asp Gly Asn Gln Phe 35	40	45
Gln Lys Ala Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Thr 50	55	60
Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Thr Trp Asp Glu Thr 65	70	75
Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu 85	90	95
Glu Ala Cys Met Met Gln Glu Val Gly Val Glu Asp Thr Pro Leu Met 100	105	110
Asn Val Asp Ser Ile Leu Thr Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr 115	120	125
Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val 130	135	140
Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Ala Asn Leu Gln Glu 145	150	155
Arg Leu Arg Arg Lys Glu 165		

<210> 12
 <211> 166
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human IFN alpha-6 protein

<400> 12

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly His Arg Arg Thr Met Met
 1 5 10 15
 Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
 20 25 30
 Arg His Asp Phe Arg Phe Pro Gln Glu Glu Phe Asp Gly Asn Gln Phe
 35 40 45
 Gln Lys Ala Glu Ala Ile Ser Val Leu His Glu Val Ile Gln Gln Thr
 50 55 60
 Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Val Ala Trp Asp Glu Arg
 65 70 75 80
 Leu Leu Asp Lys Leu Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu
 85 90 95
 Glu Ala Cys Val Met Gln Glu Val Trp Val Gly Gly Thr Pro Leu Met
 100 105 110
 Asn Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
 115 120 125
 Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
 130 135 140
 Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Ser Ser Arg Asn Leu Gln Glu
 145 150 155 160
 Arg Leu Arg Arg Lys Glu
 165

<210> 13

<211> 166

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human IFN alpha-7 protein

<400> 13

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Arg Asn Arg Arg Ala Leu Ile
 1 5 10 15
 Leu Leu Ala Gln Met Gly Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Lys Asp
 20 25 30
 Arg His Glu Phe Arg Phe Pro Glu Glu Phe Asp Gly His Gln Phe
 35 40 45
 Gln Lys Thr Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Thr
 50 55 60

Phe Asn Leu Phe Ser Thr Glu Asp Ser Ser Ala Ala Trp Glu Gln Ser
 65 70 75 80
 Leu Leu Glu Lys Phe Ser Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu
 85 90 95
 Glu Ala Cys Val Ile Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Thr Pro Leu Met
 100 105 110
 Asn Glu Asp Phe Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
 115 120 125
 Leu Tyr Leu Met Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
 130 135 140
 Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Phe Ser Thr Asn Leu Lys Lys
 145 150 155 160
 Gly Leu Arg Arg Lys Asp
 165

 <210> 14
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <223> Human IFN alpha-8 protein

 <400> 14
 Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Asn Arg Arg Ala Leu Ile
 1 5 10 15
 Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Lys Asp
 20 25 30
 Arg His Asp Phe Glu Phe Pro Gln Glu Glu Phe Asp Asp Lys Gln Phe
 35 40 45
 Gln Lys Ala Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Thr
 50 55 60
 Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Leu Asp Glu Thr
 65 70 75 80
 Leu Leu Asp Glu Phe Tyr Ile Glu Leu Asp Gln Gln Leu Asn Asp Leu
 85 90 95
 Glu Val Leu Cys Asp Gln Glu Val Gly Val Ile Glu Ser Pro Leu Met
 100 105 110
 Tyr Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
 115 120 125
 Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Ser Cys Ala Trp Glu Val Val
 130 135 140
 Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Ile Asn Leu Gln Lys
 145 150 155 160

Arg Leu Lys Ser Lys Glu
165

<210> 15
<211> 166
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human IFN alpha-10 protein

<400> 15
Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Asn Arg Arg Ala Leu Ile
1 5 10 15
Leu Leu Gly Gln Met Gly Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30
Arg His Asp Phe Arg Ile Pro Gln Glu Phe Asp Gly Asn Gln Phe
35 40 45
Gln Lys Ala Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Thr
50 55 60
Phe Asn Leu Phe Ser Thr Glu Asp Ser Ser Ala Ala Trp Glu Gln Ser
65 70 75 80
Leu Leu Glu Lys Phe Ser Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu
85 90 95
Glu Ala Cys Val Ile Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Thr Pro Leu Met
100 105 110
Asn Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
115 120 125
Leu Tyr Leu Ile Glu Arg Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
130 135 140
Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Leu Ser Phe Ser Thr Asn Leu Gln Lys
145 150 155 160
Arg Leu Arg Arg Lys Asp
165

<210> 16
<211> 170
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human IFN alpha-14 protein

<400> 16
Cys Ser Leu Gly Cys Asn Leu Ser Gln Thr His Ser Leu Asn Asn Arg
1 5 10 15
Arg Thr Leu Met Leu Met Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Ser
20 25 30

Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Glu Phe Pro Gln Glu Glu Phe Asp
 35 40 45
 Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu Met
 50 55 60
 Met Gln Gln Thr Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asn Ser Ser Ala Ala
 65 70 75 80
 Trp Asp Glu Thr Leu Leu Glu Lys Phe Tyr Ile Glu Leu Phe Gln Gln
 85 90 95
 Met Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Glu Val Gly Val Glu Glu
 100 105 110
 Thr Pro Leu Met Asn Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Lys Lys Tyr Phe
 115 120 125
 Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Met Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala
 130 135 140
 Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Phe Ser Thr
 145 150 155 160
 Asn Leu Gln Lys Arg Leu Arg Arg Lys Asp
 165 170

 <210> 17
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <223> Human IFN alpha-16 protein

 <400> 17
 Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Asn Arg Arg Ala Leu Ile
 1 5 10 15
 Leu Leu Ala Gln Met Gly Arg Ile Ser His Phe Ser Cys Leu Lys Asp
 20 25 30
 Arg Tyr Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Val Phe Asp Gly Asn Gln Phe
 35 40 45
 Gln Lys Ala Gln Ala Ile Ser Ala Phe His Glu Met Ile Gln Gln Thr
 50 55 60
 Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr
 65 70 75 80
 Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Ile Glu Leu Phe Gln Gln Leu Asn Asp Leu
 85 90 95
 Glu Ala Cys Val Thr Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Ile Ala Leu Met
 100 105 110
 Asn Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
 115 120 125

Leu Tyr Leu Met Gly Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
130 135 140

Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Phe Ser Thr Asn Leu Gln Lys
145 150 155 160

Gly Leu Arg Arg Lys Asp
165

<210> 18

<211> 166

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human IFN alpha-17 protein

<400> 18

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Asn Arg Arg Ala Leu Ile
1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Gly Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30

Arg His Asp Phe Gly Leu Pro Gln Glu Glu Phe Asp Gly Asn Gln Phe
35 40 45

Gln Lys Thr Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Thr
50 55 60

Phe Asn Leu Phe Ser Thr Glu Asp Ser Ser Ala Ala Trp Glu Gln Ser
65 70 75 80

Leu Leu Glu Lys Phe Ser Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asn Leu
85 90 95

Glu Ala Cys Val Ile Gln Glu Val Gly Met Glu Glu Thr Pro Leu Met
100 105 110

Asn Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
115 120 125

Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
130 135 140

Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Leu Ser Phe Ser Thr Asn Leu Gln Lys
145 150 155 160

Ile Leu Arg Arg Lys Asp
165

<210> 19

<211> 166

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human IFN alpha-21 protein

<400> 19
 Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Asn Arg Arg Ala Leu Ile
 1 5 10 15
 Leu Leu Ala Gln Met Gly Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Lys Asp
 20 25 30
 Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Asp Gly Asn Gln Phe
 35 40 45
 Gln Lys Ala Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Thr
 50 55 60
 Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Thr Trp Glu Gln Ser
 65 70 75 80
 Leu Leu Glu Lys Phe Ser Thr Glu Leu Asn Gln Gln Leu Asn Asp Leu
 85 90 95
 Glu Ala Cys Val Ile Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Thr Pro Leu Met
 100 105 110
 Asn Val Asp Ser Ile Leu Ala Val Lys Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
 115 120 125
 Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
 130 135 140
 Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Lys Ile Phe Gln Glu
 145 150 155 160
 Arg Leu Arg Arg Lys Glu
 165

<210> 20

<211> 172

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human IFN delta-1 protein

<400> 20

Cys Asp Leu Ser Gln Asn His Val Leu Val Gly Arg Lys Asn Leu Arg
 1 5 10 15
 Leu Leu Asp Glu Met Arg Arg Leu Ser Pro His Phe Cys Leu Gln Asp
 20 25 30
 Arg Lys Asp Phe Ala Leu Pro Gln Glu Met Val Glu Gly Gly Gln Leu
 35 40 45
 Gln Glu Ala Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu Met Leu Gln Gln Ser
 50 55 60
 Phe Asn Leu Phe His Thr Glu His Ser Ser Ala Ala Trp Asp Thr Thr
 65 70 75 80
 Leu Leu Glu Pro Cys Arg Thr Gly Leu His Gln Gln Leu Asp Asn Leu

	85	90	95
Asp Ala Cys Leu Gly Gln Val Met Gly Glu Glu Asp Ser Ala Leu Gly			
	100	105	110
Arg Thr Gly Pro Thr Leu Ala Leu Lys Arg Tyr Phe Gln Gly Ile His			
	115	120	125
Val Tyr Leu Lys Glu Lys Gly Tyr Ser Asp Cys Ala Trp Glu Thr Val			
	130	135	140
Arg Leu Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Ser Leu Ile Ser Leu Gln Glu			
	145	150	155
Arg Leu Arg Met Met Asp Gly Asp Leu Ser Ser Pro			
	165	170	
<210> 21			
<211> 172			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<220>			
<223> Human IFN omega-1 protein			
<400> 21			
Cys Asp Leu Pro Gln Asn His Gly Leu Leu Ser Arg Asn Thr Leu Val			
	1	5	10
Leu Leu His Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Leu Cys Leu Lys Asp			
	20	25	30
Arg Arg Asp Phe Arg Phe Pro Gln Glu Met Val Lys Gly Ser Gln Leu			
	35	40	45
Gln Lys Ala His Val Met Ser Val Leu His Glu Met Leu Gln Gln Ile			
	50	55	60
Phe Ser Leu Phe His Thr Glu Arg Ser Ser Ala Ala Trp Asn Met Thr			
	65	70	75
Leu Leu Asp Gln Leu His Thr Gly Leu His Gln Gln Leu Gln His Leu			
	85	90	95
Glu Thr Cys Leu Leu Gln Val Val Gly Glu Gly Glu Ser Ala Gly Ala			
	100	105	110
Ile Ser Ser Pro Ala Leu Thr Leu Arg Arg Tyr Phe Gln Gly Ile Arg			
	115	120	125
Val Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Asp Cys Ala Trp Glu Val Val			
	130	135	140
Arg Met Glu Ile Met Lys Ser Leu Phe Leu Ser Thr Asn Met Gln Glu			
	145	150	155
Arg Leu Arg Ser Lys Asp Arg Asp Leu Gly Ser Ser			
	165	170	

<210> 22
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <220>
 <223> Mouse IFN alpha-1 protein

 <400> 22
 Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Asn Leu Arg Asn Lys Arg Ala Leu Thr
 1 5 10 15
 Leu Leu Val Gln Met Arg Arg Leu Ser Pro Leu Ser Cys Leu Lys Asp
 20 25 30
 Arg Lys Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Lys Val Asp Ala Gln Gln Ile
 35 40 45
 Lys Lys Ala Gln Ala Ile Pro Val Leu Ser Glu Leu Thr Gln Gln Ile
 50 55 60
 Leu Asn Ile Phe Thr Ser Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asn Ala Thr
 65 70 75 80
 Leu Leu Asp Ser Phe Cys Asn Asp Leu His Gln Gln Leu Asn Asp Leu
 85 90 95
 Gln Gly Cys Leu Met Gln Gln Val Gly Val Gln Glu Phe Pro Leu Thr
 100 105 110
 Gln Glu Asp Ala Leu Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe His Arg Ile Thr
 115 120 125
 Val Tyr Leu Arg Glu Lys Lys His Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
 130 135 140
 Arg Ala Glu Val Trp Arg Ala Leu Ser Ser Ser Ala Asn Val Leu Gly
 145 150 155 160
 Arg Leu Arg Glu Glu Lys
 165

 <210> 23
 <211> 167
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <220>
 <223> Mouse IFN alpha-2 protein

 <400> 23
 Cys Asp Leu Pro His Thr Tyr Asn Leu Arg Asn Lys Arg Ala Leu Lys
 1 5 10 15
 Val Leu Ala Gln Met Arg Arg Leu Pro Phe Leu Ser Cys Leu Lys Asp
 20 25 30
 Arg Gln Asp Phe Gly Phe Pro Leu Glu Lys Val Asp Asn Gln Gln Ile
 35 40 45

Gln Lys Ala Gln Ala Ile Pro Val Leu Arg Asp Leu Thr Gln Gln Thr
 50 55 60

Leu Asn Leu Phe Thr Ser Lys Ala Ser Ser Ala Ala Trp Asn Ala Thr
 65 70 75 80

Leu Leu Asp Ser Phe Cys Asn Asp Leu His Gln Gln Leu Asn Asp Leu
 85 90 95

Gln Thr Cys Leu Met Gln Gln Val Gly Val Gln Gln Pro Pro Leu Thr
 100 105 110

Gln Glu Asp Ala Leu Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe His Arg Ile Thr
 115 120 125

Val Tyr Leu Arg Glu Lys Lys His Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
 130 135 140

Arg Ala Glu Val Trp Arg Ala Leu Ser Ser Ser Val Asn Leu Leu Pro
 145 150 155 160

Arg Leu Ser Glu Glu Lys Glu
 165

<210> 24

<211> 162

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> Mouse IFN alpha-4 protein

<400> 24

Cys Asp Leu Pro His Thr Tyr Asn Leu Gly Asn Lys Arg Ala Leu Thr
 1 5 10 15

Val Leu Glu Glu Met Arg Arg Leu Pro Pro Leu Ser Cys Leu Lys Asp
 20 25 30

Arg Lys Asp Phe Gly Phe Pro Leu Glu Lys Val Asp Asn Gln Gln Ile
 35 40 45

Gln Lys Ala Gln Ala Ile Leu Val Leu Arg Asp Leu Thr Gln Gln Ile
 50 55 60

Leu Asn Leu Phe Thr Ser Lys Asp Leu Ser Ala Thr Trp Asn Ala Thr
 65 70 75 80

Leu Leu Asp Ser Phe Cys Asn Asp Leu His Gln Gln Leu Asn Asp Leu
 85 90 95

Lys Ala Cys Val Met Gln Glu Pro Pro Leu Thr Gln Glu Asp Ser Leu
 100 105 110

Leu Ala Val Arg Thr Tyr Phe His Arg Ile Thr Val Leu Arg Lys
 115 120 125

Lys Lys His Ser Leu Cys Ala Trp Glu Val Ile Arg Ala Glu Val Trp
 130 135 140

Arg Ala Leu Ser Ser Ser Thr Asn Leu Leu Ala Arg Leu Ser Glu Glu
145 150 155 160

Lys Glu

<210> 25

<211> 166

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> Mouse IFN alpha-5 protein

<400> 25

Cys Asp Leu Leu Gln Thr His Asn Leu Arg Asn Lys Arg Ala Leu Thr
1 5 10 15

Leu Leu Val Lys Met Arg Arg Leu Ser Pro Leu Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30

Arg Lys Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Lys Val Gly Ala Gln Gln Ile
35 40 45

Gln Glu Ala Gln Ala Ile Pro Val Leu Ser Glu Leu Thr Gln Gln Val
50 55 60

Leu Asn Ile Phe Thr Ser Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asn Ala Thr
65 70 75 80

Leu Leu Asp Ser Phe Cys Asn Glu Val His Gln Gln Leu Asn Asp Leu
85 90 95

Lys Ala Cys Val Met Gln Gln Val Gly Val Gln Glu Ser Pro Leu Thr
100 105 110

Gln Glu Asp Ser Leu Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe His Arg Ile Thr
115 120 125

Val Tyr Leu Arg Glu Lys Lys His Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
130 135 140

Arg Ala Glu Val Trp Arg Ala Leu Ser Ser Ser Val Asn Leu Leu Ala
145 150 155 160

Arg Leu Ser Lys Glu Glu
165

<210> 26

<211> 166

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> Mouse IFN alpha-6 protein

<400> 26

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Asn Leu Arg Asn Lys Arg Ala Leu Thr
1 5 10 15

Leu Leu Val Lys Met Arg Arg Leu Ser Pro Leu Ser Cys Leu Lys Asp
 20 25 30
 Arg Lys Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Lys Val Gly Ala Gln Gln Ile
 35 40 45
 Gln Glu Ala Gln Ala Ile Pro Val Leu Thr Glu Leu Thr Gln Gln Ile
 50 55 60
 Leu Thr Leu Phe Thr Ser Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asn Ala Thr
 65 70 75 80
 Leu Leu Asp Ser Phe Cys Asn Asp Leu His Gln Leu Leu Asn Asp Leu
 85 90 95
 Gln Gly Cys Leu Met Gln Gln Val Glu Ile Gln Ala Leu Pro Leu Thr
 100 105 110
 Gln Glu Asp Ser Leu Leu Ala Val Arg Thr Tyr Phe His Arg Ile Thr
 115 120 125
 Val Phe Leu Arg Glu Lys Lys His Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
 130 135 140
 Arg Ala Glu Val Trp Arg Ala Leu Ser Ser Ser Ala Lys Leu Leu Ala
 145 150 155 160
 Arg Leu Asn Glu Asp Glu
 165

<210> 27

<211> 167

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> Mouse IFN alpha-7 protein

<400> 27

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Asn Leu Arg Asn Lys Arg Ala Leu Thr
 1 5 10 15
 Leu Leu Val Lys Met Arg Arg Leu Ser Pro Leu Ser Cys Leu Lys Asp
 20 25 30
 Arg Lys Asp Phe Gly Phe Pro Gln Ala Lys Val Asp Ala Gln Gln Ile
 35 40 45
 Gln Glu Ala Gln Ala Ile Pro Val Leu Ser Glu Leu Thr Gln Gln Ile
 50 55 60
 Leu Asn Ile Phe Thr Ser Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asn Ala Thr
 65 70 75 80
 Leu Leu Asp Ser Val Cys Asn Asp Leu His Gln Gln Leu Asn Asp Leu
 85 90 95
 Gln Gly Cys Leu Met Gln Glu Val Gly Val Gln Glu Leu Ser Leu Thr
 100 105 110

Gln Glu Asp Ser Leu Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe His Arg Ile Thr
115 120 125

Val Phe Leu Arg Glu Lys Lys His Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
130 135 140

Arg Ala Glu Ile Trp Arg Ala Leu Ser Ser Ser Ala Asn Leu Leu Ala
145 150 155 160

Arg Leu Ser Glu Lys Lys Glu
165

<210> 28

<211> 166

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> Mouse IFN alpha-8 protein

<400> 28

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Asn Leu Arg Asn Lys Arg Ala Leu Thr
1 5 10 15

Leu Leu Val Lys Met Arg Arg Leu Ser Pro Leu Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30

Arg Lys Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Lys Val Gly Ala Gln Gln Ile
35 40 45

Gln Glu Ala Gln Ala Ile Pro Val Leu Thr Glu Leu Thr Gln Gln Ile
50 55 60

Leu Ala Leu Phe Thr Ser Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asn Ala Thr
65 70 75 80

Leu Leu Asp Ser Phe Cys Asn Asp Leu His Gln Leu Leu Asn Asp Leu
85 90 95

Gln Gly Cys Leu Met Gln Gln Val Glu Ile Gln Ala Leu Pro Leu Thr
100 105 110

Gln Glu Asp Ser Leu Leu Ala Val Arg Thr Tyr Phe His Arg Ile Thr
115 120 125

Val Phe Leu Arg Glu Lys Lys His Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
130 135 140

Arg Ala Glu Val Trp Arg Ala Leu Ser Ser Ser Ala Lys Leu Leu Ala
145 150 155 160

Arg Leu Asn Glu Asp Glu
165

<210> 29

<211> 167

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> Mouse IFN alpha-9 protein

<400> 29

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Asn Leu Arg Asn Lys Lys Ile Leu Thr
 1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Leu Ser Pro Leu Ser Cys Leu Lys Asp
 20 25 30

Arg Lys Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Lys Val Asp Ala Gln Gln Ile
 35 40 45

Gln Glu Ala Gln Ala Ile Pro Val Leu Ser Glu Leu Thr Gln Gln Ile
 50 55 60

Leu Thr Leu Phe Thr Ser Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asn Ala Thr
 65 70 75 80

Leu Leu Asp Ser Phe Cys Thr Gly Leu His Gln Leu Leu Asn Asp Leu
 85 90 95

Gln Gly Cys Leu Met Gln Leu Val Gly Met Lys Glu Leu Pro Leu Thr
 100 105 110

Gln Glu Asp Ser Gln Leu Ala Met Lys Lys Tyr Phe His Arg Ile Thr
 115 120 125

Val Tyr Leu Arg Glu Lys Lys His Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
 130 135 140

Arg Ala Glu Val Trp Arg Ala Leu Ser Ser Val Asn Leu Leu Ala
 145 150 155 160

Arg Leu Ser Glu Glu Lys Glu
 165

【図1A】

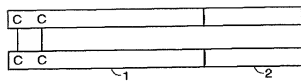


FIG. 1A

【図1B】

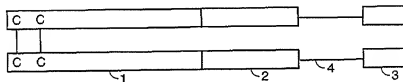


FIG. 1B

【図1C】

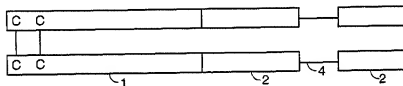


FIG. 1C

【図2】

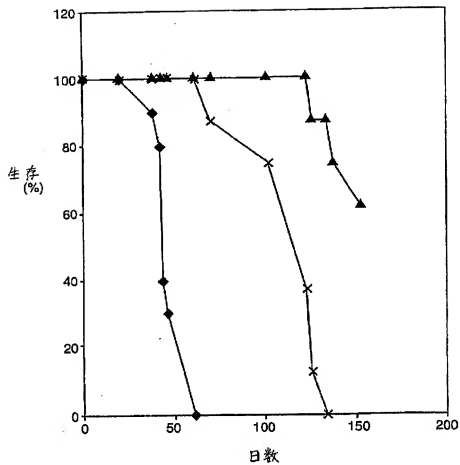


FIG. 2

【図3】

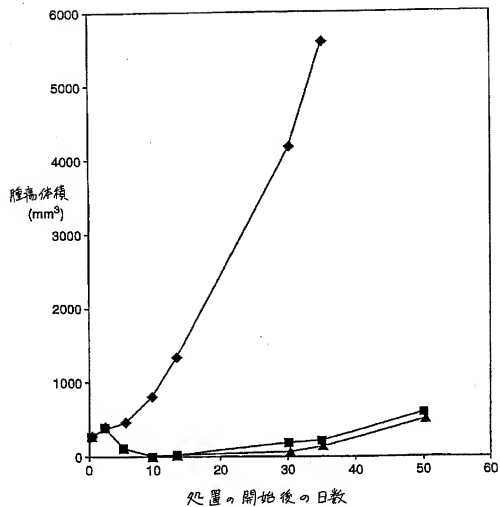


FIG. 3

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int. Appl. No.
PCT/US 00/13827

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/715 C12N15/63 C12N15/62 C12N15/86 C07K19/00 C12N15/21 C12N15/863 A61K38/21 //C07K14/62		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, MEDLINE, EPO-internal, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indications, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 97 24137 A (TANOX BIOSYSTEMS INC) 10 July 1997 (1997-07-10) abstract page 3, line 2 - line 11 page 4, line 1 - line 22 page 5, line 20 - line 22 page 6, line 13 - line 21 page 9, line 6 --- -/-	1-29
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to substantiate the publication date of another citation or other special reason (see specification) "O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 October 2000		Date of mailing of the international search report 24.10.00
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 6918 Patentkanal 2 NL-5000 HT Rijswijk Tel. (+31-70) 546-2040, Tx. 31 851 epo nl, Fax (+31-70) 546-3018		Authoritative office Montrone, M

2

Form: PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1993)

page 1 of 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 00/13827

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Description of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>LO KIN-MING ET AL: "High level expression and secretion of Fc-X fusion proteins in mammalian cells." PROTEIN ENGINEERING, vol. 11, no. 6, June 1998 (1998-06), pages 495-500, XP002143888 ISSN: 0269-2139 abstract page 495, column 2, paragraph 1 - paragraph 2 page 496, column 1, paragraph 4 page 496, column 2, paragraph 3 page 496, column 2, paragraph 8 page 497, column 1, paragraph 2 - column 2, paragraph 5; table 1 page 499, column 1, paragraph 2 - paragraph 3</p>	1-29
Y	<p>US 5 726 044 A (GILLIES STEPHEN D ET AL) 10 March 1998 (1998-03-10) abstract claims 1-8 column 2, line 59 - line 65 column 4, line 49 - line 60 column 5, line 36 - line 45 column 6, line 31 - line 63 column 8, line 6 - line 22 column 12, line 55 - column 13, line 31</p>	1-29
Y	<p>US 5 349 053 A (LANDOLFI NICHOLAS F) 20 September 1994 (1994-09-20) abstract column 2, line 45 - line 68 column 5, line 17 - line 44</p>	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US 00/13827
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 24 to 29 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound.	
2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:	
3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:	
1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
Remark on Protest	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. Appl. No.

PCT/US 00/13827

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9724137 A	10-07-1997	US 5723125 A	03-03-1998
		AU 701579 B	04-02-1999
		AU 1356797 A	28-07-1997
		CA 2239522 A	10-07-1997
		EP 0888122 A	07-01-1999
		JP 11505132 T	18-05-1999
		US 5908626 A	01-06-1999
US 5726044 A	10-03-1998	US 5541087 A	30-07-1996
		AU 691980 B	28-05-1998
		AU 3676595 A	29-03-1996
		CA 2199830 A	21-03-1996
		EP 0782625 A	09-07-1997
		JP 2877959 B	05-04-1999
		JP 10505751 T	09-06-1998
		WO 9608570 A	21-03-1996
US 5349053 A	20-09-1994	NONE	

Form PCT/IB/210 (patent family search) (July 1995)

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	7-コード (参考)
A 6 1 P 1/16		C 0 7 K 14/56	4 H 0 4 5
31/20		16/18	
43/00	1 1 7	19/00	
C 0 7 K 14/56		C 1 2 P 21/02	F
16/18		C 1 2 R 1:91	
19/00		C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 N 5/10		5/00	B
C 1 2 P 21/02		A 6 1 K 37/02	
/(C 1 2 N 5/10		37/66	Z
C 1 2 R 1:91)			
(C 1 2 P 21/02			
C 1 2 R 1:91)			
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, B J, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, K E, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, C H, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, K G, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, S D, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
(72)発明者	スー、 ヤービン		
	アメリカ合衆国 マサチューセッツ		
	02474, アーリントン、 プラットル		
	ドライブ 8		
(72)発明者	ガイルズ、 ステファン ディー、		
	アメリカ合衆国 マサチューセッツ		
	01741, カーライル、 サンセット ロード 159		

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA23 BA44 CA04 CA07
DA02 EA02 GA11
4B064 AG09 AG26 CA10 CA19 CA21
CC24 DA01
4B065 AA90X AB01 BA02 CA24
CA25 CA44
4C084 AA02 AA03 AA06 AA07 AA13
BA02 BA22 BA26 BA41 CA53
DA22 NA14 ZA75Z ZB03Z
ZB33Z
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA14
ZA75 ZB03 ZB33
4H045 AA10 AA11 BA20 BA41 CA30
CA40 DA16 DA75 EA28 FA74

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成19年7月5日(2007.7.5)

【公表番号】特表2003-530070(P2003-530070A)

【公表日】平成15年10月14日(2003.10.14)

【出願番号】特願2000-618329(P2000-618329)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/09	(2006.01)
A 6 1 K	35/76	(2006.01)
A 6 1 K	48/00	(2006.01)
A 6 1 P	1/16	(2006.01)
A 6 1 P	31/20	(2006.01)
A 6 1 P	43/00	(2006.01)
C 0 7 K	14/56	(2006.01)
C 0 7 K	16/18	(2006.01)
C 0 7 K	19/00	(2006.01)
C 1 2 P	21/02	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
A 6 1 K	38/00	(2006.01)
A 6 1 K	38/21	(2006.01)
C 1 2 R	1/91	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/00	Z N A A
A 6 1 K	35/76	
A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	31/20	
A 6 1 P	43/00	1 1 7
C 0 7 K	14/56	
C 0 7 K	16/18	
C 0 7 K	19/00	
C 1 2 P	21/02	F
C 1 2 N	5/00	B
A 6 1 K	37/02	
A 6 1 K	37/66	Z
C 1 2 N	5/00	B
C 1 2 R	1:91	
C 1 2 P	21/02	F
C 1 2 R	1:91	

【手続補正書】

【提出日】平成19年5月18日(2007.5.18)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 融合タンパク質をコードする核酸分子であって、以下：

(a) シグナル配列

(b) 免疫グロブリンFc領域；および

(c) インターフェロン- α を含む標的タンパク質配列

を含み、ここで、該シグナル配列、該免疫グロブリンFc領域および該標的タンパク質配列が、連続的に5' → 3' の方向にコードされる、核酸分子。

【請求項2】 前記免疫グロブリンFc領域が免疫グロブリンヒンジ領域を含む、請求項1に記載の核酸分子。

【請求項3】 前記免疫グロブリンFc領域が、免疫グロブリンヒンジ領域および免疫グロブリン重鎖定常領域ドメインを含む、請求項1に記載の核酸分子。

【請求項4】 前記免疫グロブリンFc領域が、免疫グロブリンヒンジ領域および免疫グロブリンCH3ドメインを含む、請求項1に記載の核酸分子。

【請求項5】 前記免疫グロブリンFc領域が、ヒンジ領域、CH2ドメインおよびCH3ドメインを含む、請求項1に記載の核酸分子。

【請求項6】 前記免疫グロブリンFc領域が、免疫グロブリン γ 配列の一部を含む、請求項5に記載の核酸分子。

【請求項7】 前記免疫グロブリン γ が、ヒト免疫グロブリン γ 1である、請求項6に記載の核酸分子。

【請求項8】 哺乳動物細胞をトランスフェクトするための複製可能発現ベクターであって、該ベクターが請求項1に記載の核酸分子を含む、複製可能発現ベクター。

【請求項9】 前記ベクターがウイルスベクターである、請求項8に記載の複製可能発現ベクター。

【請求項10】 請求項1に記載の核酸分子を保有する、哺乳動物細胞。

【請求項11】 アミノ酸末端からカルボン酸末端の方向で、免疫グロブリンFc領域およびインターフェロン- α を含む標的タンパク質を含む、融合タンパク質。

【請求項12】 前記インターフェロン- α が、配列番号2、7または8～21に記載されるアミノ酸配列、あるいはその種または対立遺伝子改変体を含む、請求項11に記載の融合タンパク質。

【請求項13】 前記標的タンパク質が、ポリペプチドリンカーによって連結される少なくとも2つのインターフェロン- α 分子を含む、請求項11に記載の融合タンパク質。

【請求項14】 前記免疫グロブリンFc領域を前記標的タンパク質に連結するポリペプチドリンカーをさらに含む、請求項13に記載の融合タンパク質。

【請求項15】 前記免疫グロブリンFc領域が、免疫グロブリンヒンジ領域および免疫グロブリン重鎖定常領域ドメインを含む、請求項11に記載の融合タンパク質。

【請求項16】 前記重鎖定常領域ドメインが、CH3ドメインを含む、請求項15に記載の融合タンパク質。

【請求項17】 前記免疫グロブリンFc領域が、ヒンジ領域、CH2ドメインおよびCH3ドメインを含む、請求項11に記載の融合タンパク質。

【請求項18】 共有結合を介して連結される請求項11に記載の少なくとも2つの融合タンパク質を含む、マルチマータンパク質。

【請求項19】 前記共有結合が、ジスルフィド結合である、請求項18に記載のタンパク質。

【請求項20】 融合タンパク質を産生する方法であって、以下の工程：

(a) 請求項10に記載の前記哺乳動物細胞を提供する工程；および

(b) 該融合タンパク質を産生するために該哺乳動物細胞を培養する工程、を包含する、方法。

【請求項21】 前記融合タンパク質を回収するさらなる工程を包含する、請求項20に記載の方法。

【請求項22】 前記融合タンパク質を精製するさらなる工程を包含する、請求項20に記載の方法。

【請求項 23】 前記免疫グロブリンFc領域と前記標的タンパク質との間に差し挟まれるタンパク質分解性切断部位において、該標的タンパク質から該免疫グロブリンFc領域を、タンパク質分解酵素を用いて切断するさらなる工程を包含する、請求項20に記載の方法。

【請求項 24】 インターフェロン α の投与によって軽減される状態を処置するための組成物であって、請求項1に記載の前記核酸を含む、組成物。

【請求項 25】 インターフェロン α の投与によって軽減される状態を処置するための組成物であって、請求項8に記載の前記ベクターを含む、組成物。

【請求項 26】 インターフェロン α の投与によって軽減される状態を処置するための組成物であって、請求項11に記載の前記融合タンパク質を含む、組成物。

【請求項 27】 インターフェロン α の投与によって軽減される状態を処置するための組成物であって、請求項18に記載のタンパク質を含む、組成物。

【請求項 28】 前記状態が、肝臓障害である、請求項26に記載の組成物。

【請求項 29】 前記肝臓障害が、肝炎である、請求項28に記載の組成物。

【請求項 30】 肝臓障害の処置のための医薬品の製造のための、請求項11に記載の融合タンパク質の使用。